2172

MARIO FORMISANO

UN QUADRIENNIO DI RICERCHE SUL "CALORE ROSSO" DELLE PELLI BOVINE SALATE

Lavoro eseguito con il contributo del Dipartimento di Agricoltura U. S. A. (Legge Pubblica 480).

Estratto dai « Bollettini della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti »
Vol. XL - Aprile - Giugno 1964 N. 2 - 3

Tipi A. TRANI - NAPOLI

SOMMARIO

Il problema riguardante lo studio dei fattori che presiedono alla comparsa del « calore rosso » sulle pelli bovine salate ed interferiscono sul suo evolversi e diffondersi alla superficie della pelle, ha formato oggetto di estese indagini in questi ultimi anni. Noi abbiamo riesaminato l'argomento sin dai primi studi effettuati da altri ricercatori ed abbiamo sottoposto ad esame diversi fatti nuovi che prima d'ora non erano stati presi in considerazione. Oggi, pertanto, alla luce delle esperienze degli Autori che ci hanno preceduto ed a seguito di un quadriennio di indagini da noi stessi condotte, possiamo ritenere che le cause predisponenti e concomitanti all'insorgere del danno siano sufficientemente note ed i mezzi per impedire o ridurre l'alterazione siano stati da noi abbastanza estesamente considerati e proposti all'industria conciaria, onde, il problema può dirsi pressochè definitivamente risolto.

L'alterazione, oggetto delle nostre ricerche, ha una importanza rilevante sia dal punto di vista scientifico-tecnico che pratico-applicativo e ciò perchè la sua soluzione certamente contribuirà non solo per meglio caratterizzare ed individuare gli agenti responsabili, ma anche servirà ad indicare i fattori che concorrono allo estendersi del danno e, nel contempo, troverà vasta eco nel campo applicativo se si tien conto che ogni anno i danni prodotti dal « calore rosso » alle pelli salate ammontano a diverse decine di milioni di dollari.

Noi infatti abbiamo caratterizzato diversi agenti microbici come responsabili della alterazione; abbiamo inoltre dimostrato che la alterazione stessa interessa soltanto il « lato carne » delle pelli, senza che si verifichi penetrazione dei germi con possibile danno al « lato fiore »; abbiamo infine trovato, in taluni determinati composti chimici, i mezzi che, allo stato attuale, meglio si prestano per impedire l'insorgere del danno.

La scelta di questi mezzi è stata effettuata tenendo conto delle esigenze pratiche dell'industria conciaria, nel senso cioè che riteniamo di aver posto a disposizione della industria stessa, mezzi di facile utilizzazione consistenti nel trattare il sale che normalmente si impiega sulle pelli fresche di macello con alcuni composti chimici (da applicarsi a basse concentrazioni e che incidono, al minimo, sul costo economico della salatura).

Le applicazioni che attualmente si stanno effettuando su larga scala già ci lasciano presumere che i mezzi da noi patrocinati avranno effettivamente una vera e reale efficacia.

other researchers, and we have also investigated several new factors which had never been considered before. Therefore, in the light of previous Authors' experiences, and as a results of 4 years investigations, we can consider the causes which predispose and cooperate to the occurrence of damage to be sufficiently known, and the means to prevent or reduce the alteration to have been quite extensively considered and proposed to the tanning industry, so that the problem is to be regarded as nearly definitely solved.

The alteration, which has been the subject of our research, is of paramount importance, either from scientifical-technical or practical-applicative points of view; therefore, the solution of this problem will not only contribute to a better characterization and individualization of the microbial agents concerned, but it will also be an indication of the factors which concur to spread the damage and, in the meanwhile, will be widely applied in the practice, in view of the fact that damages caused by « Red Heat » to salted hides amount, every year, to several million dollars.

In fact, we have characterized numerous microbial agents as responsible for the alteration; we have also proved that the latter affects « flesh side » only, with no penetration of the germs and consequent damage to the « grain side » occurring; finally, we have found, in certain chemical compounds, the means which proved to be most suitable in preventing the occurrence of damage.

The selection of these means has been made, bearing in mind practical requirements of the tanning industry; in fact, we feel we have provided the industry with easily applicable means, involving treatment of the curing salt currently used on green hides with some chemical compounds (to be applied at low concentrations and which hardly affect the curing costs).

Industrial scale trials, already in progress, seem to corroborate the assumption that the selected means will find wide and effective application.

ZUSAMMENFASSUNG

Ausfürliche Untersuchungen sind in den letzen Jahren überall gemacht worden, um die Faktoren die das Rotwerden auf gesalzenen Rindshäute verursachen festzustellen. Wir haben dehalb die Arbeiten der ersten Forscher dieser Branche gründlich überprüft und verschiedene neue Tatsache, die bis jetz nicht berücksichtigt wurden, so untersucht, dass nach einem Vierjahr von eigener Versuchen, können wir gut behaupten, dass die Ursache des Rotwerdens genug kekannt sei und dass auch die Mitteln zur Hemmung bzw. Verminderung der Schade von uns hinreichend in Rechnung gezogen sei um sie der Lederindustrie vorzuschlagen; somit darf die Frage als ausgelöst geschätz werden.

Die erfolgreiche Lösung dieser Problemen ist von grösser Wichtigkeit, nicht nur aus einem rein wissenschaftlichen Standpunkt sondern auch praktisch angesehen, da sie wird ohneweiteres beitragen, nicht nur zur Charakterizierung und Feststellung der verantwortlichen Agentien, sondern auch um die Faktoren zu zeigen, die der Erweiterung der

RESUME

Le problème qui regarde l'étude des facteurs qui président à l'apparition du « rougissement » sur les peaux bovines salées et qui interfèrent sur l'évolution et sur la diffusion de l'altération à la surface de la peau, a formé objet de recherches épandues dans ces années dernières. Nous avons revisé, dès les premières études effectuées par des autres chercheurs et nous avons examiné plusieurs de facteurs nouveaux qui n'avaient pas été considerés auparavant.

Aujourd'hui, après les recherches des Auteurs précédents et à la suite des recherches quadriennales conduites par nous, nous pouvons assurer que les causes prédisposantes et concomitantes à la parue du domage sont notées à suffisance et les milieux qui empêchent ou réduisent l'altération ont été, par nous, assez considerés et proposés à l'industrie du tannage, dont on peut retenir que le problème est résoudré presque d'une manière définitive.

L'altération qui a formé objet de nos recherches, a une importance sérieuse d'un point de vue scientifique-technique et pratique-applicatif et cela parce que sa solution certainement contribura non seulement pour mieux caractériser et individualiser les facteurs responsables, mais même sa solution servira à indiquer les facteurs qui prendent part à l'extension du domage et, en même temps, elle trouvera vaste écho dans l'application si on pense que chaque année les domages produits par le « rougissement » aux peaux salées montent à beaucoup de dizaine de millions de dollars.

Nous avons en effet caractérisé beaucoup de germes qui sont responsables de la altération ; nous avons de plus demontré que l'altération même intéresse seulement la surface de la viande des peaux, sans que se vérifique une pénétration des germes avec domage possible à la surface des poils ; nous avons enfin trouvé que certaines composés chimiques, à l'état actuel, empêchent la parue du domage.

Le choix de ces milieux a été effectué gardant soigneusement les exigences pratiques de l'industrie du tannage, c'est à dire que nous retenons d'avoir mis à la disposition de l'industrie même, des milieux d'utilisation facile qui consistent en traitant le sel qui est adopré normalement sur les peaux fraîches de boucherie avec des composés chimiques qu'on doit appliquer à des petites concentrations de manière qu'ils gravent le moindre sur le prix du salage.

Les applications qui, à présent, on va effectuer sur une grande échelle nous font retenir que les milieux indiqués par nous auront une efficacité réelle.

SUMMARY

The investigations dealing with the study of the factors which cooperate to the occurrence of « Red Heat » on salted bovine hides, and interfere with its evolution and spreading at the hide surface, have been the subject of extensive researches for the last few years. We have reexamined the problem, starting from the earlier studies of

altre collaterali aventi carattere semi-industriale, ci permisero di ottenere risultati soddisfacentemente positivi (4).

Nel contempo, chiedemmo ed ottenemmo che i risultati di laboratorio fossero trasferiti al campo industriale e il Dipartimento di Agricoltura U.S.A., fece applicare presso la « Armour & Co. » di Omaha (Nebraska) i metodi proposti sulla cui efficacia pratica stiamo attualmente studiandone gli effetti onde poter trarre conclusioni risolutive sull'argomento.

Indagammo in seguito su un caso di depigmentazione naturale manifestatasi sui germi alofili responsabili del « calore rosso » (5) e studiammo la natura dei pigmenti dei germi stessi nonchè il loro ruolo fisiologico in natura (6, 7).

Dall'insieme delle indagini condotte, possiamo dire di aver certamente contribuito alla migliore conoscenza del problema, il cui interesse scientifico e pratico ha spesso richiamato l'attenzione di molteplici ricercatori.

Ed ora, al fine di dare un quadro d'insieme sulle attuali conoscenze del « calore rosso » delle pelli bovine salate, passiamo in rassegna, i più interessanti lavori fin qui compiuti, soffermandoci in particolare sui risultati delle nostre indagini.

Evoluzione delle indagini sul « calore rosso » delle pelli bovine salate.

Sin dai tempi remoti si era constatato che le pelli salate, spesso e tra l'altro, presentavano macchie rosse che le deprezzavano come materia prima nell'industria di numerosi manufatti.

Le macchie stesse, aventi aspetti diversi (a strisce, a grandi pustole isolate o confluenti, di color rosso-vivo fino a marrone, umidicce, limose, rilevate), interessano spesso non solo ristrette zone sul lato carne, ma addirittura tutta la superficie della pelle.

Le prime indagini scientifiche risalgono al 1912 ad opera di Becker (8); via via e fino a giorni nostri, esse furono sempre più numerose ed approfondite [si veda la estesa bibliografia alla nota I (1)].

Sicchè oggi possiamo ritenere che su alcuni fattori di base siano concordi tutti i ricercatori e cioè che sono predisponenti e specifici alla comparsa del danno, in primo luogo, la presenza in natura (particolarmente sul salmarino e sul salgemma, ma anche nel terreno, nelle salamoie, ecc.) di microbi alotolleranti ed alofili obbligati, cromogeni o non; e poi che l'alterazione è favorita dalla reazione del mezzo (da pH = 7,0 - 8,0 e fino a pH = 11,0), dalla temperatura ambientale (anche se l'optimum è a 37°C., temperature da 20° a 55°C. sono egualmente idonee), dall'umidità relativa (solo al disopra del 60%, l'arrossamento è generalizzato ed intensificato), dalla concentra-

Schade mitwirken; gleichzeitig sollen die untersuchteten Mitteln gut in der Praxis Verwendung finden, da jedes Jahres gehen viele Tausende Milionen Dolars verloren, für Schaden die das Rotwerden an gesalzenen Haüte verursachen.

Wir haben in der Tat verschiedene michrobischen Agentien als verantwortlich für die Schade charakteriziert und sogar festgestellt, dass die Veränderung blos die Aasseite der Haüte interessiert, so dass die Keime nicht tief durchdringen können und keine Schade auf die Oberfläche der Narben herbeiführen; schliesslich, manche speziellen Verbindungen haben uns die Mitteln angeboten um bestens das Auftreten der Schade zu verhindern.

Aus diesen Mitteln wurden die jenige ausgewählt die ein recht guten Einsatz seitens der Lederindustrie ermöglichen, durch Hinzufügen dieser Verbindungen (wenig verdichteten und daraus billig) zum Konservierungssalz der üblich auf frisch geschlachteten Häute benütz wird. Die praktische Verwendung dieser auf industrie Masstab angewandeten Zusätzen lassen uns erkennen, dass die von uns vorgeschlagene Mitteln ein wircklichen und reellen Erfolg haben werden.

Introduzione.

Dopo un quadriennio di indagini microbiologiche, chimico-fisiche, istologiche, intese a ricercare le cause predisponenti e concomitanti allo insorgere e all'estendersi dell'alterazione nota col nome di « calore rosso » delle pelli bovine salate, riteniamo di avere abbastanza ampiamente preso in considerazione il problema e di avere, in definitiva, indicato alcuni mezzi sufficientemente idonei ad ovviare all'alterazione (1, 2, 3, 4, 5).

Le ricerche iniziarono con una estesa indagine bibliografica avente lo scopo di stabilire innanzitutto quanto, da altri Autori, era stato fatto sullo argomento e, nel contempo, indicammo il piano di sperimentazione che avremmo seguito a partire dallo studio della struttura e composizione chimica delle pelli, passando quindi ad indicare lo stato delle conoscenze sul « calore rosso » all'inizio delle nostre indagini e, successivamente, prendendo in esame le acquisizioni aggiornate sulle esigenze ambientali e sui caratteri dei germi alofili ed alotolleranti, nonchè sulla conseguente tassonomia microbica (1).

In prosieguo di tempo, eseguimmo un ampio e particolareggiato studio sui ceppi microbici isolati da pelli Packers affette da « calore rosso » (2); indi, al fine di accertare il modo con cui i predetti germi si impiantano e si approfondiscono nei tessuti della pelle, compimmo ricerche fisico-chimiche ed istologiche (3) sulle pelli e sui germi caratterizzati.

Avendo accertato il modo di installarsi e di prosperare dei detti germi sulla pelle, riuscimmo ad indicare alcuni mezzi di salatura mercè l'aggiunta di opportuni additivi chimici, mezzi che, nelle prove di laboratorio ed in

ed abbiamo stabilito che l'α-batteriopurpurina, all'esame stereomicroscopico, si presenta sotto forma di piastrine rombiche o quadratiche, di colore rosso, riunite in catene che, macroscopicamente, assumono un aspetto aghiforme (7).

Abbiamo studiato pure le condizioni-ambiente che hanno portato alla depigmentazione degli alofili da noi isolati e descritti (5) ed abbiamo dato una interpretazione biochimica al fenomeno osservato allorquando veniva saggiata la solubilità del pigmento (in particolare con l'etere, ma anche con l'alcool etilico e metilico), fenomeno che portava, dopo un contatto di 12-24 ore del pigmento nei solventi sopra indicati, alla formazione di leucoderivati. Abbiamo ritenuto poter spiegare questo fenomeno con la capacità del legame etereo del solvente di dar luogo alla formazione di composti di addizione con gli alogenuri metallici (nel nostro caso con NaCl), acidi alogenidrici, ecc., per cui, la sottrazione dal mezzo del NaCl che si lega nel composto di addizione formerebbe un sale di ossonio con l'etere, facendo cessare la disponibilità per le cellule microbiche del NaCl (da cui la relativa decolorazione) mediante un probabile meccanismo competitivo che si svolgerebbe per la maggiore affinità del NaCl verso l'addizione a legame etereo rispetto a quella tra gruppo proteico cellulare (ovvero pigmento) e NaCl (3, 5) e supponemmo allora che, per la formazione del pigmento negli alofili, doveva ritenersi indispensabile la presenza del NaCl, in mancanza del quale si sarebbe assistito ad uno sviluppo apigmentato.

Sostituimmo, perciò, il NaCl con altri sali che, volta a volta, possedevano l'ione Na^+ o l'ione Cl^-, ovvero nessuno dei due e ciò con lo scopo anche di confermare o meno se il NaCl fosse, oppur no, un fattore di crescita o una sostanza alimentare per lo sviluppo dei germi alofili, dimostrando in definitiva (3) che la sostituzione del NaCl con altri sali, tali da essere isotonici rispetto alla concentrazione ottimale dello stesso NaCl (ma anche senza essere isotonici), non poteva realizzarsi indifferentemente, nel senso cioè che essi non potevano sostituirsi a vicenda.

Dimostrammo, ad esempio, che il NaCl ed il KCl [che alla stessa concentrazione (10%) ed alla stessa temperatura (18°C) pur presentando gradi di dissociazione vicinissimi tra di loro (rispettivamente 93,6 e 94,2)], non potevano sostituirsi a vicenda (3) e concludemmo allora che, contrariamente a quanto avevano supposto altri ricercatori, l'azione tossica del sale era legata all'ione K^+ o all'ione Na^+ o all'intera molecola indissociata KCl o NaCl, piuttosto che all'ione Cl^-.

Per quanto riguarda, poi, la tassonomia microbica degli alofili, abbiamo condotto un esame critico di tutti i germi finora noti, ci siamo soffermati sulle difficoltà, comuni agli altri germi, di poter fondare una classificazione dei microrganismi su tutti i caratteri (morfologici, fisiologici, colturali, biochimici, ecc.) presi nel loro insieme ed abbiamo, allora, accettato, come il

zione di sale (anche col 30% di NaCl e fino a saturazione è possibile osservare la comparsa delle macchie rosse).

Anche per quanto concerne l'habitat naturale dei germi alofili, si è di accordo nel ritenere che il salmarino ed il salgemma rappresentino i più importanti e diffusi focolai di infezione.

Questi germi alofili, oltre ad avere particolari esigenze nutritive, richiedono anche mezzi e trattamenti specifici per poter essere messi in evidenza.

Sulla loro morfologia, taluni autori (9, 10, 11) avevano ritenuto in passato, che le concentrazioni saline giocassero un ruolo specifico, nel senso che si potevano osservare fenomeni di polimorfismo col variare della concentrazione per cui cellule allungate potessero dar luogo a forme a spatola, appiattite e perfino cocciche.

Noi (1, 2), in verità giammai abbiamo osservato questo presunto accentuato polimorfismo, ma solo raramente un certo pleomorfismo legato, riteniamo (come quello osservato dai ricercatori precedenti), piuttosto alle metodiche di evidenziamento. Infatti, introducendo una tecnica nuova, da noi denominata di « colorazione-scolorazione » abbiamo sempre osservato una stabile specificità morfologica e, se qui generaliziamo, è perchè il numero di ceppi che ha formato oggetto di studio era quanto mai vasto ed eterogeneo (ben 236 ceppi diversi !). Tutto ciò ben s'intende legato ad un unico substrato nutritivo e ad identiche condizioni di ambiente.

Abbiamo, così, constatato, a differenza di altri autori (12, 13) che anche ripetendo i trapianti su substrati artificiali, non si modificava la morfologia cellulare.

D'accordo, invece, con gli altri studiosi, abbiamo osservato che la pigmentazione (intensificazione o attenuazione del colore degli alofili cromogeni) è legata alle condizioni ambientali: particolarmente alla luce (5, 6, 7). Noi abbiamo ottenuto forme di alofili cromogeni, completamente apigmentati (5) ed abbiamo dimostrato che la cromogenesi è una caratteristica naturale di un particolare gruppo di germi alofili in quanto la pigmentazione rappresenta un modo di sopravvivenza dei germi quando questi sono esposti a radiazioni luminose a determinate lunghezze d'onda (6, 7).

Circa la natura del pigmento (in particolare quello rosso) degli alofili cromogeni studiati, noi abbiamo stabilito che i pigmenti sono di natura carotenoide e precisamente trattasi di una α-batteriopurpurina, ipofasica alla ripartizione tra metanolo ed etere di petrolio, formante un'unica banda al saggio cromatografico su colonna (di ossido di alluminio 1° grado di attività sec. Brockman), possedente i massimi di assorbimento a 463-494-530 mμ in alcool etilico a 95° (6, 7).

Siamo anche riusciti a cristallizzare il pigmento estratto (7) mercè lo impiego di una particolare tecnica di liofilizzazione da noi stessi elaborata,

COMPOSIZIONE CHIMICA DELLE PELLI BOVINE

Costituenti	Composizione media della pelle bovina fresca	Composizione media della pelle bovina salata: pelli nostrane salate col 25% di NaCl	Composizione media della pelle bovina salata: pelli packers americane salate col 40% di sale
Umidità	65,0	45,0	34,7
Cloruro sodico	—	13,5	16,8
Sostanza dermica	27,3	29,0	29,0
Sostanze grasse	0,75	0,75	10,5
Azoto solubile	0,45	0,65	1,5
Sostanze non determinate (pelo, sterco)	3,0	6,0	4,0
Ceneri	0,40	0,45	2,0
pH lavabile (20‰)	6,5	6,5	6,8

In % dell'estratto secco	Contenuto in lipidi della pelle bovina: Epidermide	Contenuto in lipidi della pelle bovina: Corion
Lipidi estraibili totali	8,55	1,06-11,9
Fosfolipidi totali	1,84	0,134
Lecitina	1,16	0,041
Cefalina	0,27	0,003
Sfingomielina	0,13	0,044
Colesterolo totale	1,20	0,072

Costituenti in % dell'estratto secco	Contenuto in lipidi della pelle bovina: Epidermide	Contenuto in lipidi della pelle bovina: Corion
Colesterolo esterificato	0,45	0,0
Colesterolo libero	0,75	0,072
Cere	2,98	0,48-11,0
Acidi grassi liberi	0,74	0,030
N. di jodio sui lipidi tot.	58,8	60,4

In % della proteina totale	Contenuto medio in aminoacidi della pelle bovina: Collagene di pelle	Contenuto medio in aminoacidi della pelle bovina: Gelatina
Azoto totale	18,60	18,14
Azoto ammidico	0,66	0,11
Glicina	26,2	27,5
Alanina	9,5	11,0
Leucina	5,6	3,33
Isoleucina	3,4	2,59
Valina	3,4	4,21
Serina	2,4	2,22
Treonina	0,8	0,78
Metionina	—	4,50
Cistina	15,1	0,79
Prolina	14,0	0,89
Idrossiprolina	4,2	—
Fenilalanina	1,4	16,35
Tirosina	—	14,1
Triptofano	8,8	2,23
Arginina	0,8	0,29
Istidina	4,5	—
Lisina	1,3	8,8
Idrossilisina	6,3	6,7
Acido aspartico	11,3	11,4
Acido glutammico		

Costituenti in mg %	Contenuto medio in sali minerali: della pelle bovina	Contenuto medio in sali minerali: del corion fresco di pelle di vacca
Fosforo (P_2O_5)	351	26,2
Potassio (KCl)	322-558	—
Sodio (NaCl)	122-247	353
Calcio (CaO)	15-65	3,8
Magnesio (MgO)	18-34	3,6
Arsenico	26	—
Zinco	2,4	—
Ferro (Fe_2O_3)	1,0	19
Alluminio (Al_2O_3)	—	—
Silicio (SiO_2)	0,15-1,50	3,7
Cloro (Cl)	—	213
Rame	0,56	—
Solfo (SO_3)	—	61,4
Rapporto MgO/CaO	—	1 : 1,00
Rapporto P_2O_5/CaO	—	1 : 0,14

meglio rispondente allo stato attuale delle nostre conoscenze, l'inquadramento sistematico di Elazari-Volcani (14), ritenuto già valido nell'ultima edizione del Bergey's Manual (15).

Per conseguenza, nell'Ordine *Pseudomonadales*, famiglia *Pseudomonadaceae*, esiste il genere *Halobacterium*, comprendente germi alofili obbligati, a bastoncino, talvolta pleomorfici, richiedenti almeno il 12% di NaCl per lo sviluppo e capaci di vegetare anche in substrati con sale fino a saturazione. Le specie sono talora mobili e monotriche, talaltra sono immobili, Gram-negative, in genere cromogene (con pigmento da arancione a rosso brillante, insolubile nell'acqua e del tipo carotenoide); difficilmente attaccano i carboidrati con produzione di gas; riducono i nitrati ed occasionalmente con produzione di gas; esistono pure specie incolori e termoresistenti (1, 2).

Le forme sferiche o subrotonde di alofili obbligati le abbiamo ritenute inseribili nella Famiglia *Micrococcaceae*, non escludendo però che altre specie già descritte potessero rimanere nelle famiglie *Spherophoraceae*, *Achromobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Spirillaceae*, *Rhizobiaceae*.

Risultati e Discussione.

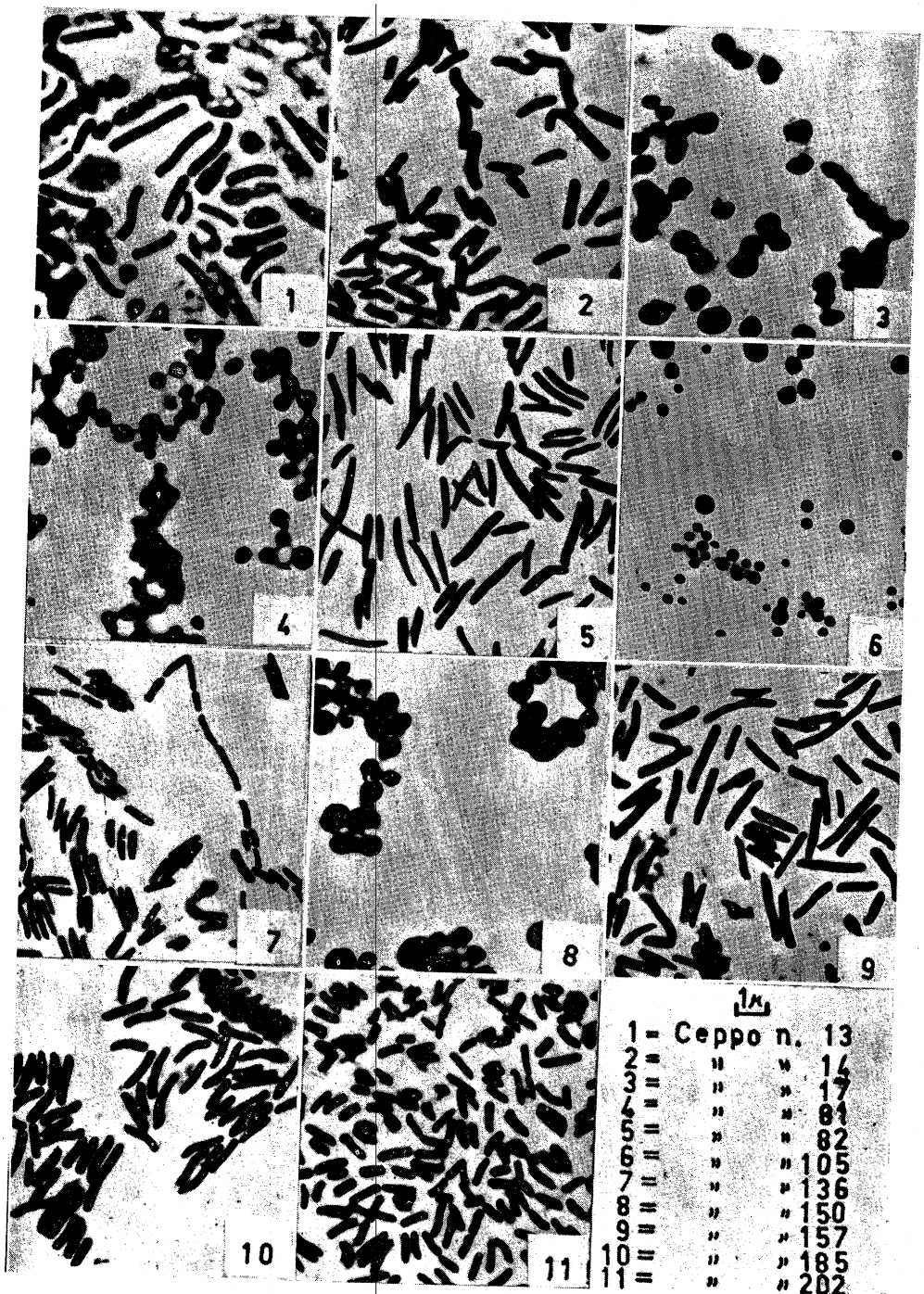
Le nostre indagini sono iniziate, come sopra indicato, con diversi esami chimici per conoscere la composizione delle pelli. Taluni dati ottenuti da altri ricercatori (16 - 20), nonchè quelli da noi stessi elaborati (1 - 3) sono riuniti nella seguente tabella:

Da essa si deduce che i costituenti principali della pelle bovina sono: 1°) l'acqua; 2°) le sostanze proteiche; 3°) i lipidi; 4°) i glucidi; 5°) i sali minerali.

L'acqua oscilla in genere tra il 60 ed il 70% nelle pelli fresche e tra il 45-50% in quelle salate. Le proteine sono rappresentate, per la massima parte, da collagene che costituisce circa il 30% della proteina totale del corpo del mammifero e possiede circa il 99,8% dell'azoto totale.

Il collagene è legato a glicoproteine e mucopolisaccaridi, spesso così tenacemente che riesce difficile ottenerlo allo stato di assoluta purezza. Il collagene possiede aminoacidi (particolarmente elevato è il contenuto in glicina, prolina ed idrossiprolina, mentre scarsi sono tutti gli aminoacidi aromatici), carboidrati (particolarmente glucosio e galattosio), mucoidi o mucoproteine (aminozuccheri uniti a peptidi o proteine), glicoproteine (carboidrati polimeri comprendenti acido ialuronico e solfato di condroitina).

I lipidi sono rappresentati da trigliceridi, cere, ceridi, fosfolipidi, nonchè da steroli.



1μ

1 = Ceppo n. 13
2 = " " 14
3 = " " 17
4 = " " 81
5 = " " 82
6 = " " 105
7 = " " 136
8 = " " 150
9 = " " 157
10 = " " 185
11 = " " 202

I carboidrati sono costituiti non solo da zuccheri derivati da un'unica sostanza monomera, ma anche da polisaccaridi (in particolare glicogeno), nonchè da aminozuccheri (glucosammina e galattosammina).

I sali minerali sono, per la maggior parte, rappresentati da fosforo e potassio e, in ordine decrescente, da sodio, calcio, magnesio, arsenico, zinco, ferro, silicio e rame.

Passando a studiare il fenomeno alterativo nel suo insieme, abbiamo ritenuto che il « calore rosso » è di origine microbica: esso, però, non è la conseguenza dell'attività di un solo germe, in quanto sono responsabili diversi microrganismi schizomicetici, alofili obbligati e cromogeni, rappresentati da forme batteriche (più numerose) e da forme cocciche.

Non mancano però germi alofili apigmentati e germi alotolleranti ai quali può attribuirsi un'azione concomitante o talvolta anche esaltatrice della vera causa alterativa.

Le predette forme di alofili obbligati cromogeni sono di difficile evidenziamento e di difficile coltivazione.

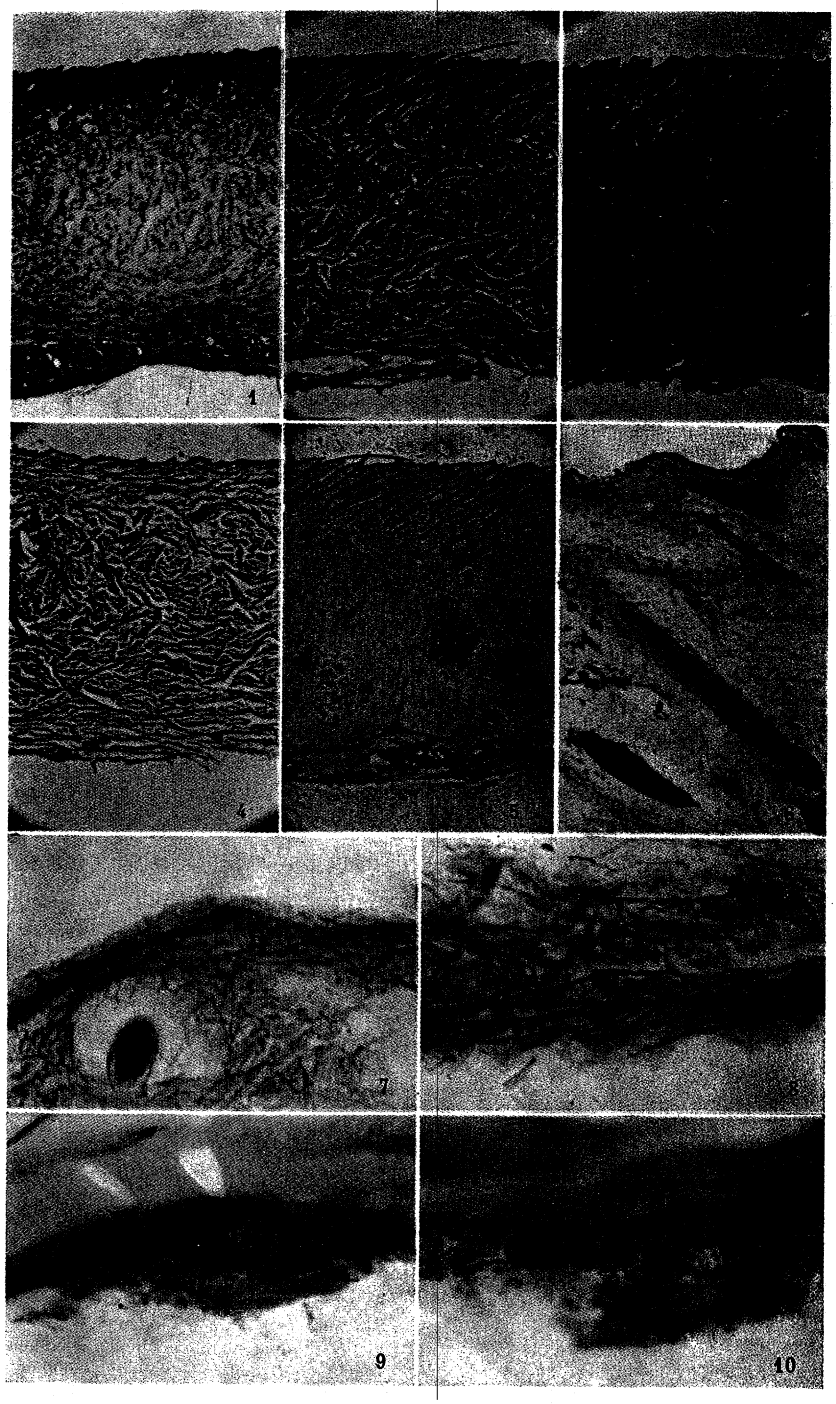
Queste difficoltà, incontrate già dai ricercatori precedenti, sono state, riteniamo, sufficientemente superate dalla utilizzazione di metodiche da noi stessi elaborate.

Ad esempio, siamo riusciti ad eliminare una delle principali cause di errore nell'allestimento dei preparati microscopici per lo studio della morfologia cellulare, errori che erano legati soprattutto al trasporto del NaCl sul preparato (particolarmente per quello colorato) e sull'addensamento delle soluzioni coloranti che avevano preoccupato anche i precedenti ricercatori in quanto veniva resa molto difficoltosa l'osservazione, per la interferenza di questi elementi estranei nel campo microscopico.

Noi perciò constatammo innanzitutto che il materiale microbico, nello allestimento dei preparati microscopici, dovesse essere stemperato in acqua distillata contenente il 20% di NaCl: infatti le cellule scoppiavano se stemperate in sola acqua.

Per i preparati con colorazioni semplici, ovviammo alla precipitazione delle soluzioni coloranti, modificando il metodo classico e precisamente: dopo stemperamento del materiale da esaminare in acqua col 20% di NaCl, l'asciugamento non si effettuava alla fiamma, ma avveniva a temperatura ambiente o in termostato ma, comunque, non superiore a 37°C e la fissazione si eseguiva con alcool etilico assoluto, indi si colorava prima e si scolorava poi, in modo che soltanto i microbi conservassero la colorazione impartita, mentre le sostanze estranee e particolarmente i cristallini di cloruro sodico si presentavano incolori.

Anche per quanto riguarda la coltivazione degli alofili isolati, oltre ai


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

substrati già patrocinati da precedenti ricercatori e da noi stessi utilizzati, ideammo alcuni mezzi colturali, fra l'altro una pappa di patata salata ed un decotto di patata salata, che abbiamo sempre applicati con il risultato di intensificare, in maniera positiva, in particolare la pigmentazione dei microrganismi.

Nello studio delle attività metaboliche dei germi caratterizzati impiegammo nuove metodiche da noi stessi elaborate e ricercammo altre funzioni biologiche (termoresistenza, attività lipolitiche, ecc.) dei germi che non erano state prese in considerazione, in precedenza.

Studiammo, inoltre, l'influenza dei fattori dell'ambiente sulla crescita degli alofili isolati (in presenza di vitamine nel mezzo di coltura, di sostanze ad azione oligodinamica, ecc.) e sul metabolismo cellulare (in particolare prendemmo in esame gli effetti della sostituzione del NaCl nel mezzo).

I 236 ceppi microbici isolati furono, dopo il completamento delle indagini microbiologiche, riuniti in 11 germi, differenziati tra loro, di cui alcuni furono riportati a specie già note [*Halobacterium halobium* (Petter) Elazari-Volcani, *Sarcina litoralis* Poulsen, *Halobacterium cutirubrum* (Lochhead) Elazari-Volcani, *Halobacterium trapanicum* (Petter) Elazari-Volcani] ed altri furono ritenuti nuove specie o varietà (*Micrococcus Riccardi* n.sp. Formisano, *Halobacterium Simoncinii* n. sp. Formisano, *Halobacterium cutirubrum thermophilum* n. var. Formisano, *Micrococcus morrhuae denitrolipolyticus* n. var. Formisano, *Halobacterium cutirubrum proteolyticum* n. var. Formisano, *Halobacterium Simoncinii neapolitanum* n. var. Formisano).

Dimostrammo che tutti i germi da noi descritti (di cui, in appendice, riuniamo i caratteri più significativi) sono da considerare agenti specifici del « calore rosso) in quanto essi dettero sempre risultato positivo nelle prove di reinfezione su pelli bovine sane e salate e che inoltre, l'attività dei predetti germi era più marcata in ambiente a concentrazione di pH 6,5 - 8,0 e che al disotto di pH = 6,0 ogni attività si arresta.

La concentrazione ottimale di NaCl si aggira, per gli alofili obbligati da noi isolati e descritti, intorno al 27,5%, con un minimo a 20% ed un massimo a 32%. Per gli alotolleranti, pure da noi caratterizzati, il minimo si aggira sul 6%.

Descrivemmo pure ceppi termoresistenti (uno di essi: *Micrococcus Riccardi* n. sp. resiste al riscaldamento fino a 80°C. per 10 minuti primi) e, per quanto riguarda l'influenza di fattori dell'ambiente, osservammo che le sostanze vitaminiche e quelle ad azione oligodinamica non esercitavano alcuna influenza sul metabolismo microbico e dimostrammo ampiamente che il NaCl nel mezzo colturale rappresenta piuttosto un regolatore della pressione osmotica cellulare o della tensione superficiale del mezzo, anzichè un fattore

LEGGENDA

1. - Sezione trasversale di pelle bovina Packers colorata con ematossilina-eosina di Meyer;
2. - come in 1, ma colorata con resorcina-fucsina di Weighert, per l'evidenziamento delle fibre elastiche;
3. - come in 2, per l'evidenziamento della modica riduzione del rapporto di intima contiguità tra fibra e fibra;
4. - come in 1, ma colorata con bleu di toluidina-eosina per l'evidenziamento della infezione microbica sullo strato superficiale del « lato carne »;
5. - sezione trasversale a partire dal « lato fiore », colorata con emateina alluminosa di Van Gieson per l'evidenziamento del connettivo sottocutaneo, dell'involucro epiteliale e dei peli;
6. - come in 5, ma colorata al Sudan III, per l'evidenziamento della localizzazione del grasso: questo si appalesa sotto forma di infiltrati e di depositi irregolari negli interspazi delle fibre collageniche del corion;
7. - come in 5, ma colorata con resorcina-fucsina di Weighert per l'evidenziamento delle fibre elastiche della zona papillare del derma (« lato fiore »);
8. - come in 7, ma per l'evidenziamento delle fibre elastiche degli strati profondi;
9. - sezione trasversale a partire dal « lato carne », colorata con bleu di toluidina-eosina, per l'evidenziamento delle forme microbiche: queste risultano localizzate nella zona marginale ipodermica;
10. - come in 9, ma colorata con bleu di Löffler.

nonchè le irregolarità riscontrate sotto forma di infiltrati e di depositi negli interspazi delle fibre collageniche del corion (oltrechè al limite del tessuto connettivale sottocutaneo), non hanno il significato di specifica alterazione in quanto sono riscontrabili in tutte le pelli bovine ed in particolare in quelle più ricche in sostanze lipidiche.

Per quanto concerne i risultati circa la presenza delle forme microbiche del « calore rosso » nei diversi strati dei tessuti, abbiamo osservato che i germi suddetti si localizzano soltanto nella zona marginale ipodermica, ciò perchè, a partire da questa zona, non sono stati riscontrati approfondimenti dei germi e, se qualche forma microbica è stata rinvenuta in zone più alte verso il lato fiore, si tratta certamente di localizzazione inerente alla manualità di tecnica e, pertanto, ad un trasporto puramente meccanico e non già ad un processo di penetrazione dei germi in profondità.

Per le fibre collageniche, sia dello strato papillare, sia di quello reticolare, egualmente non sono state evidenziate significative alterazioni. Se il loro aspetto fascicolato è risultato talora non del tutto rispondente alla norma, abbiamo ritenuto che ciò fosse dovuto piuttosto a cause fisico-chimiche legate ai processi di salatura delle pelli.

I peli, infine, sono sempre apparsi ben fissati nel loro involucro epiteliale e quest'ultimo è risultato sempre ben conservato.

Passando allo studio dei mezzi per impedire l'insorgere del « calore rosso » abbiamo trovato che, tra i numerosi composti saggiati, il dimetilditiocarbammato di zinco (utilizzato come prodotto commerciale in vendita in Italia col nome di « Criptam » con titolo dell'80% di prodotto tecnico conosciuto come « Ziram ») e il cloridrato di chinina (Farmacopea Ufficiale Italiana) rappresentano le sostanze che meglio hanno risposto ai fini di impedire il manifestarsi del danno.

Infatti, in prove di laboratorio ed in altre collaterali aventi carattere semi-industriale, i composti predetti (impiegati trattando il NaCl comune per la salatura, rispettivamente alle concentrazioni del 0,0035% e del 0,02% su peso-sale) hanno protetto le pelli dall'attacco del « calore rosso » per un tempo che supera largamente il periodo massimo di conservazione delle pelli stesse per la utilizzazione nell'industria dei manufatti.

Allo stato attuale, i risultati positivi già raggiunti fino all'ottavo mese dal trattamento, possono essere estesi addirittura a 15 mesi, nel senso cioè che anche dopo questo lunghissimo periodo di tempo sulle pelli salate con l'aggiunta delle sostanze da noi patrocinate non si sono manifestate alterazioni di sorta.

Intanto, i nostri germi precedentemente caratterizzati, allevati su pappa di patata salata sec. Formisano, in fiasche di Roux (e ciò allo scopo di poter

di crescita microbica ed, ancora, che il NaCl non può essere sostituito, indifferentemente, nei substrati nutritivi, sia pure da altri sali aventi la stessa isotonia, alla medesima concentrazione.

Per quanto concerne il modo di impiantarsi e di prosperare dei germi sulla superficie della pelle constatammo attraverso estese indagini istologiche e chimico-fisiche (di cui alcuni reperti dei metodi applicati sono riuniti nella tavola che segue) che i germi stessi trovano nella predetta zona superficiale del lato carne tutte le sostanze di cui hanno bisogno per la loro crescita (proteine, lipidi, glucidi, sali minerali ed acqua), il tutto favorito o intensificato dalle condizioni ambiente, quali temperatura ed umidità ottimali.

Dimostrammo, conseguentemente, che non vi è una penetrazione, *sensu strictiori,* nei tessuti della pelle, ma è conseguenza dell'attacco dei germi tutta una serie di alterazioni fisico-chimiche nei costituenti della pelle ed in particolare di quelli che vengono a diretto contatto coi germi.

Supponemmo, perciò, che anche, ad esempio, i lipidi della pelle (in conseguenza dell'attività dei germi possedenti azione lipolitica) potessero egualmente andare soggetti a fenomeni di degradazione con liberazione di acidi grassi e con eventuale alterazione, anche profonda, della normale localizzazione del grasso sulla pelle stessa.

La « sostanza basale », così pure il « sebo » (il quale ultimo normalmente fuoriesce dalle ghiandole sebacee) concorrono alla nutrizione dei germi specifici.

Indicammo, infine, che se il « calore rosso » è allo stato iniziale di attacco alle pelli, esso non arreca alcun disturbo al processo di concia ed alle caratteristiche merceologiche del cuoio finito e solo se esso interessasse direttamente il corion (cioè le fibre collageniche), allora ci sarebbe da temere un vero e proprio danno.

Infatti, dall'esame comparato delle osservazioni microscopiche eseguite sui preparati istologici, previa infezione provocata con gli alofili isolati, dimostrammo che per quanto riguarda le fibre elastiche della zona papillare del derma (lato fiore) non sono rilevabili significative alterazioni e solo per quello degli strati profondi si riscontrano alterazioni riguardo al numero, alla forma ed al decorso delle fibre stesse. Tali alterazioni possono essere messe in relazione con le modificazioni di tutta la superficie marginale ipodermica, derivanti da un certo disordine della configurazione della zona rispetto alla normale isto-architettura dei costituenti fibrillari del derma e ciò, certamente, come conseguenza di un'azione disorganizzatrice, anche se modica, esercitata sul margine superiore del corion in seguito alla infezione provocata dagli agenti microbici del « calore rosso ».

Le localizzazioni lipidiche, poi, evidenziate negli altri saggi istologici,

Le conclusioni che si sono potute trarre da questo complesso di indagini, vengono qui di seguito indicate:

a) I pigmenti degli alofili obbligati cromogeni da noi caratterizzati sono di natura carotenoide, ipofasici alla ripartizione tra metanolo ed etere di petrolio, a funzione alcoolica, riportabili alle xantofille libere;

b) i massimi di assorbimento nei diversi solventi (metanolo, etanolo, cloroformio, esano normale, solfuro di carbonio ed etere etilico), nonchè lo studio cromatografico dell'estratto secco del pigmento, hanno indicato chiaramente che si è in presenza di un unico pigmento riportabile ad α-batteriopurpurina;

c) non è stato possibile evidenziare una β-batteriopurpurina, come affermato da Petter (24) per *Halobacterium halobium* (germe questo pure da noi preso in considerazione) per cui i nostri risultati sono stati strettamente concordanti con quelli ottenuti da Lederer (25) sullo stesso germe; per il quale fu dimostrata la esistenza del solo isomero α;

d) il pigmento estratto è stato ampiamente da noi studiato giungendo alla sua cristallizzazione: da etere etilico, infatti, l'α-batteriopurpurina ha mostrato essere rappresentata, all'esame stereomicroscopico, da piastrine rombiche o quadratiche, di color rosso, riunite in catene che macroscopicamente hanno un aspetto aghiforme;

e) sulla produzione del pigmento da parte dei germi specifici hanno notevole influenza le radiazioni luminose in rapporto alla loro lunghezza d'onda: infatti quelle comprese tra 500 e 800 mμ (luce da giallo-arancione a rosso) hanno dato la massima intensità di colorazione, pari a 200-214% (facendo eguale a 100 la densità ottica dell'estratto metanolico del pigmento sintetizzato dalle colture sviluppate alla luce naturale). Le radiazioni da 320 a 450 mμ (luce da indaco a violetto) hanno dato invece una colorazione molto tenue, pari al 55,7 - 88%, assai vicina a quella ottenuta allevando i germi all'oscurità completa (pari a 44,6%).

In seguito alle surriferite indagini abbiamo ritenuto poter supporre che, in natura, i pigmenti degli alofili cromogeni debbano avere un ruolo fisiologico assai importante che presumibilmente si estrinseca proteggendo i germi stessi e, pertanto, assicurandone la sopravvivenza. allorquando le radiazioni luminose diventano tossiche.

Sarà necessario, però, indagare ancora sulle differenze tra i germi a diversa intensità di colore (fino a quelli ottenibili eventualmente apigmentati), per quanto concerne, in particolare, i diversi caratteri metabolici.

Occorrerà, a nostro avviso, studiare fra l'altro, particolarmente l'acquisto o perdita di determinate funzioni enzimatiche « strettamente alofile » sotto l'influenza delle radiazioni luminose.

Noi riteniamo che il capitolo riguardante le predette particolari funzioni

accumulo, nel substrato colturale, di qualche composto che esplichi azione depigmentante.

Indipendentemente dallo studio dei fattori predisponenti e concomitanti all'insorgere del « calore rosso » sulle pelli salate, così come era stato in precedenza preventivato, compimmo a parte alcune estese indagini sulla caratterizzazione e sul ruolo fisiologico dei pigmenti dei germi alofili obbligati cromogeni (6, 7).

Il pigmento venne estratto dalle cellule umide seguendo la metodica di Kuhn e Brockmann (21), modificata da Sobin e Stahly (22) e, dopo evaporazione dei solventi sotto vuoto, il pigmento raccolto fu sottoposto ad indagine cromatografica su colonna di allumina (mm 120 × 10), 1° grado di attività secondo Brockmann e, parallelamente su colonna di carbonato di calcio, adoperando come solventi sviluppatori, per le colonne di allumina: etere di petrolio, benzene, etere etilico ed alcool isopropilico e, per quelle di $CaCO_3$: solfuro di carbonio.

Dopo sviluppo ed eluzione in solventi speciali per spettrofotometria (alcool etilico, alcool metilico, esano, cloroformio e solfuro di carbonio) vennero eseguite letture allo spettrofotometro Optica CF/4 da 400 a 600 mμ. Furono eseguite anche indagini quantitative sui pigmenti sintetizzati nonchè ricerche per la caratterizzazione del pigmento.

Questo infatti fu liofilizzato (impiegando un eluto in etere etilico anidro), determinando in seguito gli spettri e relative curve di assorbimento in diversi reagenti speciali, evidenziandone infine la natura, mediante il saggio allo acido solforico e con la metodica di Carr e Price (23).

Studiammo successivamente l'effetto della luce sulla carotenogenesi nei germi alofili mercè l'impiego della Cella climatica di Brabender opportunamente disposta in modo da ottenere nella camera di sviluppo (7) una temperatura ed un'umidità costanti, rispettivamente di 37°C e del 75%. Utilizzando una speciale lampada « solare » Osram Ultra-Vitalux di 300 Watt, munita di riflettore interno ed opportunamente montata in corrispondenza della finestra dello sportello della Cella, realizzammo, mediante l'uso di filtri interferenziali a determinate lunghezze d'onda, radiazioni luminose di tutto lo spettro visibile, nonchè nel campo dell'ultravioletto. Compimmo prove comparative di sviluppo e di pigmentazione dei germi nelle condizioni sopraddette rispetto a condizioni di sviluppo dei germi alla luce naturale (diurna e notturna), nonchè all'oscurità completa.

I risultati ottenuti dalle indagini quantitative svolte al fine di determinare il contenuto relativo di batteriopurpurina in ciascun ceppo dimostrarono che i valori della densità ottica dell'estratto metanolico del pigmento erano sempre più elevati per quei ceppi che apparivano in coltura più marcatamente rossi (v. tab. n. 6).

Halobacterium cutirubrum (Lochhead) Elazari-Volcani, var. *proteolyticum* Form., *Halobacterium Simoncinii* Form. e *Halobacterium Simoncinii* Form., var. *neapolitanum* Form.

Questi germi hanno dato sempre risultato positivo nelle prove di reinfezione su pelli bovine sane e salate.

6°) Il NaCl nel mezzo di coltura, per l'allevamento degli alofili obbligati da noi caratterizzati, non può considerarsi un fattore di crescita, ma piuttosto un regolatore della pressione osmotica cellulare e della tensione superficiale del mezzo. Detto NaCl non può però essere sostituito indifferentemente con altro sale, anche se questo possedesse la stessa isotonia alla medesima concentrazione.

7°) Nessuna alterazione profonda è riscontrabile nell'intima struttura istologica dei tessuti della pelle e ciò in quanto i germi non si approfondiscono, ma si sviluppano soltanto sulla superficie del « lato carne ».

8°) Per impedire l'insorgere del danno può impiegarsi, al momento della salatura delle pelli fresche, il NaCl trattato con cloridrato di chinina o con dimetilditiocarbammato di zinco, rispettivamente alle concentrazioni di 0,02% e 0,0035% su peso-sale. In tal modo le pelli si presentano indenni dall'alterazione per un periodo di tempo che supera largamente quello durante il quale le pelli stesse vengono utilizzate nella industria dei manufatti.

9°) Il pigmento degli alofili cromogeni da noi studiati è del tipo carotenoide e precisamente è riportabile ad α-batteriopurpurina. Questo pigmento, ipofasico alla ripartizione tra metanolo ed etere di petrolio, appare formato da un'unica banda all'esame cromatografico su colonna di allumina e di carbonato di calcio. Siamo riusciti a cristallizzarlo ed esso è apparso, all'esame stereomicroscopico, costituito da cristalli cubici o rombici in catena, aghiformi. Abbiamo dimostrato pure che la cromogenesi nei germi è influenzata dalle radiazioni luminose: quelle comprese tra 600 e 800 mμ di lunghezza d'onda sono le più attive.

10°) La scolorazione delle patine manifestatasi spontaneamente nei ceppi da noi allevati non è risultata legata all'esaurimento dell'O_2 dallo ambiente, nè alla perdita di umidità relativa, nè ancora alla presenza di un principio litico nel mezzo di coltura. Solo la luce è responsabile della depigmentazione ed è essa che condiziona il ruolo fisiologico dei pigmenti dei germi stessi in natura.

Stazione Sperimentale per l'Industria delle Pelli e delle Materie Concianti — Napoli - Torino.

Istituto di Microbiologia agraria e tecnica della Università di Napoli.

enzimatiche dei germi alofili meriti una ampia considerazione, essendo convinti che gli alofili debbano possedere un meccanismo tale da controllare la disidratazione del protoplasma cellulare, dal momento che è stato dimostrato che internamente alle cellule vi è sempre una concentrazione salina considerevolmente minore che nel mezzo ambiente e, d'altro canto, essendo stato già stabilito che la concentrazione di NaCl, ottimale per la crescita del germe, talora inattiva alcune funzioni enzimatiche del germe stesso.

Ed è su questo argomento che intendiamo compiere ulteriori investigazioni.

Conclusioni.

Allo stato attuale delle indagini da noi condotte sul « calore rosso » delle pelli bovine salate, riteniamo poter trarre le seguenti conclusioni:

1°) L'alterazione è causata da agenti microbici alofili obbligati e cromogeni, particolarmente del gruppo degli schizomiceti. Non si esclude però, nel contempo, che l'azione di questi germi specifici venga rafforzata ed esaltata da altri germi apigmentati, alotolleranti, nonchè da forme microbiche appartenenti ad altri gruppi tassonomici.

2°) L'alterazione si manifesta con la presenza di macchie rosse, isolate o confluenti, interessanti talora ristrette zone, ma più spesso l'intera superficie del « lato carne » della pelle. Anche se è possibile meccanicamente rimuovere le macchie dalle zone colorate, la trasmissione degli agenti infettanti e del danno correlativo sono facilmente realizzabili mercè il semplice contatto di una pelle alterata con una pelle sana.

3°) Il focolaio della infezione risiede nel sale adoperato nei processi di salatura delle pelli fresche e nel terreno che imbratta le pelli quando esse vi permangono, per tempi più o meno lunghi, dopo la mattazione degli animali.

4°) Dato che le specie microbiche specifiche posseggono proprietà morfo-fisio-biochimiche *sui generis*, richiedono mezzi e metodi particolari per il loro evidenziamento e per la loro caratterizzazione.

5°) I germi responsabili dell'alterazione, da noi isolati e descritti, sono stati i seguenti: *Halobacterium halobium* (Petter) Elazari-Volcani, *Halobacterium cutirubrum* (Lochhead) Elazari-Volcani, var. *thermophilum* Formisano, *Sarcina litoralis* Poulsen, *Micrococcus Riccardi* Formisano, *Halobacterium cutirubrum* (Lochhead) Elazari-Volcani, *Micrococcus morrhuae* Klebahn, var. *lipolyticus* Form., *Halobacterium trapanicum* (Petter) Elazari-Volcani, *Micrococcus morrhuae* Klebahn, var. *denitrolipolyticus* Form.,

15) BREED R. S., MURRAY E. G., SMITH N. R. : *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 7ª ediz., Ed. Williams-Wilkins Comp., Baltimore, 1957.

16) KOPPENHOEFER R. M. : Die Lipoide von Schaffellen. *Jour. Amer. Leather Chem., Assoc.*, vol. 33, 1938, p. 203.

17) BOWES J. H., KENTEN R. H. : Some observations on the amino acid distribution of collagen, elastin, and reticular tissue from different sources. *Biochem. Jour.*, vol. 45, 1949, p. 281.

18) EASTOE J. E. : Amino acid composition of collagen and gelatin of man, ox, pig, whale and wallaby. *Biochem. Jour.*, vol. 61, 1955, p. 589.

19) LEUTSTER: cit. da Highberger J. H.: A half century of progress in collagen chemistry. *Jour. Amer. Leather Chem. Assoc.*, vol. 48, 1953, p. 704.

20) MC LAUGHIN G. D., THEIS E. R. : Notes on animal skin composition. *Jour. Amer. Leather Chem. Assoc.*, vol. 19, 1924, p. 428.

21) KUHN R., BROCKMANN H. : Bestimmung von Carotenoides. *Zeitsch. physiol. Chem.*, vol. 206, 1932, p. 41.

22) SOBIN B., STAHLY G. L.: The isolation and adsorption spectrum maxima of bacterial carotenoid pigments. *Jour. Bact.*, vol. 44, 1942, p. 265.

23) CARR F. H., PRICE E. A. : Colour reactions attributed to vitamin A. *Biochem. Jour.*, vol. 20, 1926, p. 497.

24) PETTER H. F. : On bacteria of salted fish. *Komintl. Akad. Wetenshap.*, vol. 34, 1931, pag. 1417.

25) LEDERER M. E. : Sur les carotenoides des Cryptogames. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, vol. 20, 1939, p. 611.

26) BAXTER R. M. : Carotenoid pigments of halophilic bacteria. *Can. Jour. Microb.*, vol. 6, 1960, p. 417.

27) NANDY S. C., SEN S. N. : Effect of environment on growth and carotenogenesis of Sarcina litoralis. *Can. Jour. Microb.*, vol. 9, 1963, p. 601.

B I B L I O G R A F I A

1) Formisano M. : Ricerche sul « calore rosso » delle pelli salate. Nota I. *Boll. Staz. Sperim. Ind. Pelli e Mat. Conc.*, vol. 38, n. 1, 1962, p. 11.

2) Formisano M. : Ricerche sul « calore rosso » ecc. Nota II. Isolamento e caratterizzazione degli agenti microbici causanti l'alterazione. *Ibidem*, vol. 38, nn. 2 e 3, 1962, p. 100 e p. 183.

3) Formisano M., Meduri A., Volpe T. : Ricerche sul « calore rosso » ecc. Nota III. Indagini microbiologiche, chimico-fisiche ed istologiche. *Ibidem*, vol. 38 n. 5, 1962, pag. 325.

4) Formisano M., Simoncini A., Meduri A. : Ricerche sul « calore rosso » ecc. Nota IV. Studio dei mezzi per prevenire l'alterazione. *Ibidem*, vol. 39, n. 1, 1963, pag. 3.

5) Formisano M., Meduri A. : Ricerche sul « calore rosso » ecc. Nota V. Su di un caso di depigmentazione degli alofili cromogeni precedentemente isolati e descritti. *Ibidem*, vol. 39, n. 4, 1963, p. 239.

6) Formisano M., Coppola S. : Sulla natura del pigmento dell'alofilo obbligato « Micrococcus Riccardi » n. sp. Formisano. *Ann. Facoltà Agraria Univ. Napoli*, ser. III, vol. 29, 1963, p. 147.

7) Formisano M., Coppola S. : Caratterizzazione e ruolo fisiologico dei pigmenti dei germi alofili obbligati cromogeni. *Ibidem*, ser. III, vol. 29, 1963, p. 303.

8) Becker H. : Die Salzflecken. *Collegium*, 1912, p. 411.

9) Spruit C. J., Pijper A. : An obligate halophilic bacterium from solar salt. *Antony van Leeuwenhoeck Jour. Microb. Seror.*, vol. 18, 1952, p. 190.

10) Stuart L. S. : The morphology of bacteria causing reddening of salted hides. *Jour. Amer. Leather Chem Assoc.*, vol. 30, 1935, p. 226.

11) Lochhead A. G. : Notes on the taxonomic position of the red chromogenic halophilic bacteria. *Jour. Bact.*, vol. 45, 1943, p. 574.

12) Smithies W. R., Gibbons N. E. : The dexossiribose nucleic acid slime layer of some halophilic bacteria. *Can. Journ. Microb.*, vol. 1, 1955, p. 614.

13) Smithies W. R., Gibbons N. E., Bayler S. T. : The chemical composition of the cell and cell wall of some halophilic bacteria. *Ibidem*, vol. 1, 1955, p. 605.

14) Elazari-Volcani B. : Studies on the microflora of the Dead Sea. *Thesis Hebrew Univ. Jerusalem*, Israel, 1940.

Ceppo n. 150

Cocco immobile, Gram-negativo, con patina rossa su agar-sale; con optimum di temperatura a 33-37°C e di umidità a 65%; alofilo obbligato, con un minimum di NaCl del 15%. E' gelatinolitico, proteolitico, lipolitico; riduce i nitrati a nitriti; produce 36 γ/ml di ammoniaca; non produce idrogeno solforato, indolo, anidride carbonica. Assimila ma non fermenta saccarosio, lattosio, glicerina e mannite. Il pigmento, di natura carotenoide, è solubile in alcool etilico, metilico, cloroformio, etere etilico, acetone, piridina, alcool butilico e, dopo un contatto di 12-18 ore con etanolo, metanolo, etere etilico, si trasforma in leucoprodotto. Assimila le vitamine (particolarmente la A, la B_1, la B_6, la C), e gli aminoacidi (glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, tirosina, prolina, istidina). Fa parte della famiglia delle *Micrococcaceae* ed è una varietà nuova di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, n. var. *denitrolipolyticus* Formisano.

Ceppo n. 157

Batterio immobile, Gram-negativo, con patina da rosa-pallida a rossa su agar-sale, termoresistente, con optimum di temperatura a 37-40°C e di umidità a 65%. Alotollerante, con minimum di NaCl del 6%. E' gelatinolitico, proteolitico, amilolitico, lipolitico. Riduce debolmente i nitrati a nitriti; produce 64 γ/ml di ammoniaca, non produce idrogeno solforato, nè indolo, nè anidride carbonica. Assimila ma non fermenta saccarosio, raffinosio, glicerina e mannite. Il pigmento, di natura carotenoide, è solubile in alcool etilico, metilico, etere etilico, acetone, piridina, alcool butilico e, dopo un contatto di 6-18 ore con etanolo, metanolo, etere etilico, si trasforma in leucoprodotto. Assimila le vitamine (particolarmente la B_1, la C e la D_2) e gli aminoacidi (glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, tirosina, prolina, istidina). Fa parte della famiglia delle *Pseudomonadaceae* ed è una varietà nuova di *Halobacterium cutirubrum* (Lechhead) Elazari-Volcani, n. var. *proteolyticum* Formisano.

Ceppo n. 185

Batterio immobile, Gram-negativo, con patina rosea-rossa su agar-sale, termoresistente, con optimum di temperatura a 33-37°C e di umidità a 65%. Alofilo obbligato, con minimum di NaCl del 10%. E' gelatinolitico, proteo-

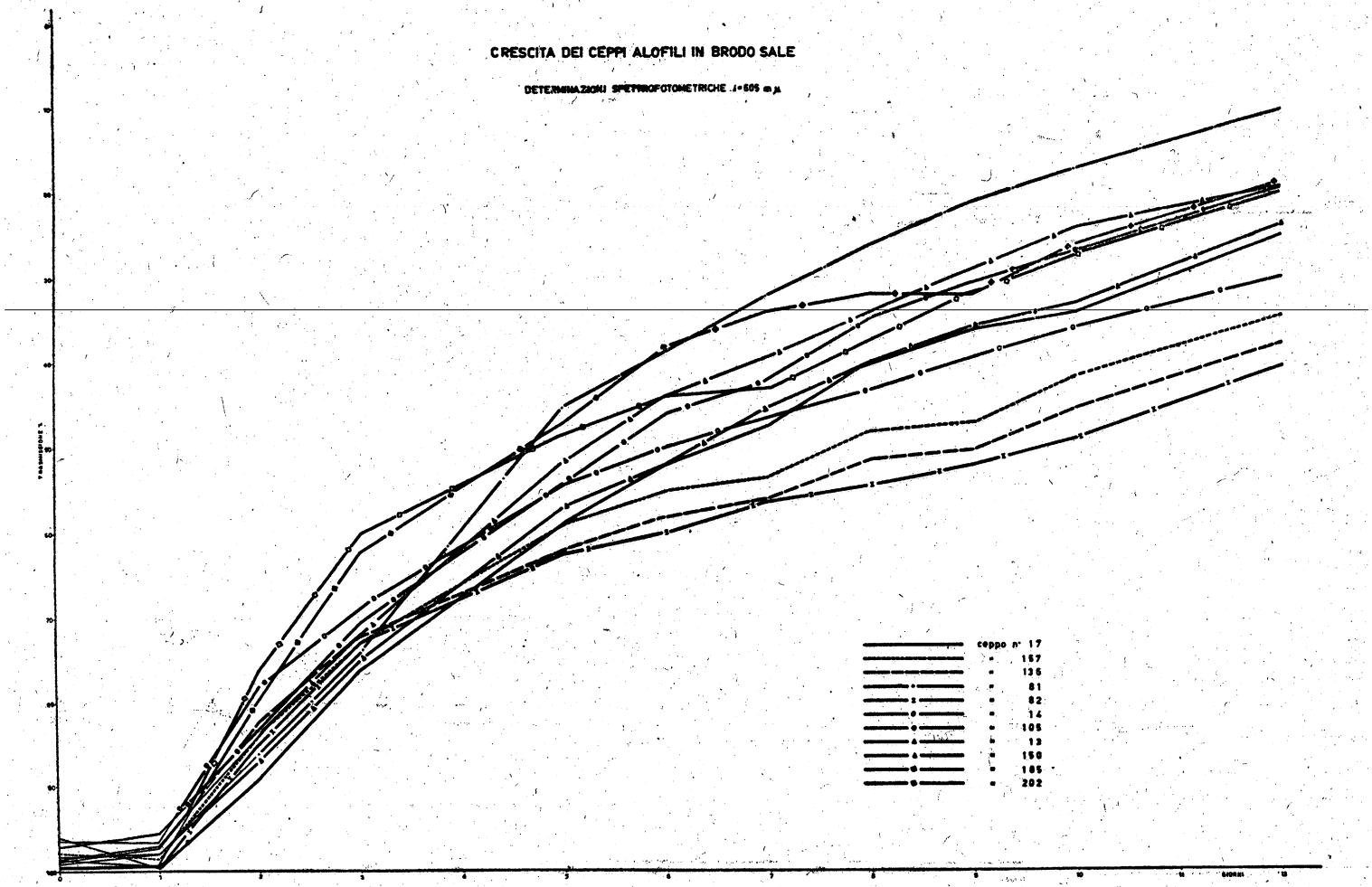
amilolitico, nè lipolitico; non riduce i nitrati, non produce idrogeno solforato, nè indolo, nè anidride carbonica; produce 64 γ/ml di ammoniaca. Assimila ma non fermenta saccarosio, raffinosio, glicerina e mannite; il pigmento, di natura carotenoide, è solubile in acetone ed alcool butilico. Assimila scarsamente le vitamine ad eccezione della C e della E; assimila fortemente glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, tirosina, prolina e istidina. Fa parte della famiglia delle *Pseudomonadaceae* ed è riportabile a *Halobacterium cutirubrum* (Lochhead) Elazari-Volcani.

Ceppo n. 105

Pleomorfo, immobile, Gram-negativo, con patina jalino-rosea su agar-sale, con optimum di temperatura a 33-37°C e di umidità a 85%; alofilo obbligato, con minimum di NaCl del 20%. Non è gelatinolitico, nè caseinolitico, nè amilolitico. E' lipolitico, riduce i nitrati a nitriti; produce 56 γ/ml di ammoniaca. Non produce idrogeno solforato, nè indolo, nè anidride carbonica. Assimila ma non fermenta saccarosio, raffinosio, glicerina e mannite; il pigmento, di natura carotenoide, è solubile in acetone ed alcool butilico; assimila fortemente le vitamine (in particolare la A, la B_1 e la C); non assimila gli aminoacidi. Fa parte della famiglia delle *Micrococcaceae* ed è una varietà nuova di *Micrococcus morrhuae* Klebahn, n. var. *lipolyticus* Formisano.

Ceppo n. 136

Batterio immobile, Gram-negativo, con patina rosea-rossa su agar-sale, con optimum di temperatura a 33-37°C e di umidità a 65%; alotollerante, con un minimum di NaCl del 4%. Non è gelatinolitico, nè proteolitico, nè amilolitico, nè lipolitico. Riduce i nitrati; produce 34 γ/ml di ammoniaca. Non produce idrogeno solforato, nè indolo, nè anidride carbonica. Assimila ma non fermenta saccarosio, raffinosio, glicerina e mannite. Il pigmento, di natura carotenoide, è solubile in alcool etilico, metilico, etere etilico, acetone e piridina e, dopo un contatto di 12-18 ore con etanolo, metanolo, etere etilico, si trasforma in leucoprodotto. Assimila scarsamente le vitamine ma fortemente gli aminoacidi (glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, tirosina, prolina, istidina). Fa parte della famiglia delle *Pseudomonadaceae* ed è riportabile a *Halobacterium trapanicum* (Petter) Elazari-Volcani.


CRESCITA DEI CEPPI ALOFILI IN BRODO SALE
DETERMINAZIONI SPETTROFOTOMETRICHE λ=505 mμ
% TRASMISSIONE
ORE
ceppo n° 17
" 157
" 136
" 81
" 82
" 14
" 105
" 13
" 150
" 185
" 202

litico, caseinolitico, lipolitico. Riduce debolmente i nitrati a nitriti; produce 101 γ/ml di ammoniaca; non produce idrogeno solforato, nè indolo, nè anidride carbonica. Assimila ma non fermenta saccarosio, raffinosio, glicerina e mannite. Il pigmento, di natura carotenoide è solubile in cloruro di metilene, alcool etilico, metilico, etere etilico, cloroformio, acetone, piridina, alcool butilico e, dopo un contatto di 12-24 ore con etanolo, metanolo, etere etilico, si trasforma in leucoprodotto. Assimila le vitamine (in particolare la A, la B_1, la B_2, la B_6, la C, la E) e gli aminoacidi (glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, tirosina, prolina, istidina). Fa parte della famiglia delle *Pseudomonadaceae* ed è una specie nuova: *Halobacterium Simoncinii* Formisano.

Ceppo n. 202

Batterio immobile, Gram-negativo, con patina rosea su agar-sale, termoresistente, con optimum di temperatura a 33-37°C e di umidità a 65%. Alofilo obbligato, con un minimum di NaCl del 15%. E' gelatinolitico, proteolitico, caseinolitico, lipolitico; non è amilolitico. Riduce i nitrati a nitriti; produce 82 γ/ml di ammoniaca. Non produce idrogeno solforato, nè indolo, nè anidride carbonica. Assimila ma non fermenta saccarosio, raffinosio, glicerina e mannite. Il pigmento, di natura carotenoide, è solubile in alcool etilico, metilico, cloroformio, etere etilico, acetone e piridina e, dopo un contatto di 6-18 ore con etanolo, metanolo, etere etilico, si trasforma in leucoprodotto. Assimila le vitamine (in particolare la A, la B_1, la B_2, la B_6, la C, la D_2, la E) e gli aminoacidi (glicina, acido glutammico, asparagina, leucina, valina, tirosina, prolina, istidina). Fa parte della famiglia delle *Pseudomonadaceae* ed è una varietà nuova di *Halobacterium Simoncinii* Formisano, n. var. *neapolitanum* Formisano.

TABELLA 2

INFLUENZA DI DIVERSI SALI, A CONCENTRAZIONE ISOTONICA RISPETTO AL NaCl, SULLA CRESCITA DEI GERMI

Ceppo	SALI																							
	NaCl			KCl			$NaNO_3$			KNO_3			NH_4Cl			NH_4NO_3			Na_2SO_4			Na-citrato		
	CONCENTRAZIONE PERCENTUALE																							
	27,5			34,09			39,4			46,61			24,7			28,9			32,74			45,2		
	CRESCITA (DETERMINAZIONI TURBIDIMETRICHE E SVILUPPO SU AGAR O SILICO-GEL)																							
	al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno		al tempo 0	al 12° giorno	
N. 13	35,8	78,2	++	36,1	14,1	—	31,2	65,0	+	28,1	14,1	—	35,3	25,0	—	32,5	27,5	—	27,8	30,1	—	44,5	13,5	—
N. 14	36,0	65,8	++	32,9	16,0	—	33,0	58,2	+	27,9	14,0	—	34,5	25,2	—	33,0	27,0	—	27,8	56,2	+	42,0	16,1	—
N. 17	35,0	55,2	++	32,1	19,0	—	22,1	55,0	+	27,0	17,2	—	34,9	25,5	—	28,3	23,0	—	27,1	35,5	—	41,0	15,3	—
N. 81	34,5	52,2	++	31,9	19,2	—	24,0	65,5	+	27,5	18,0	—	39,2	23,1	—	28,0	22,0	—	27,5	42,0	—	38,0	18,1	—
N. 82	32,5	83,0	++	32,2	18,5	—	23,5	61,2	+	27,3	19,1	—	39,2	24,0	—	27,9	26,2	—	26,0	43,0	—	43,5	17,5	—
N. 105	32,5	83,1	++	30,5	17,5	—	24,0	72,5	+	27,0	18,5	—	35,0	24,2	—	27,0	24,5	—	26,9	46,0	+	45,0	16,2	—
N. 136	31,0	76,6	++	29,5	17,4	—	22,5	69,0	+	26,3	17,4	—	32,3	23,1	—	27,0	22,0	—	26,0	54,1	—	40,5	45,0	—
N. 150	31,8	72,0	++	30,5	18,0	—	23,0	74,9	+	27,0	66,8	+	32,1	24,2	—	27,0	21,8	—	25,8	41,0	—	42,0	20,0	—
N. 157	29,5	84,0	++	30,5	18,5	—	22,0	63,0	+	26,0	16,5	—	35,0	25,0	—	27,0	21,0	—	26,2	42,3	—	41,0	17,5	—
N. 185	29,2	78,1	++	29,8	17,5	—	23,1	33,5	±	26,0	17,2	—	34,0	23,5	—	27,1	22,0	—	26,5	59,0	—	46,0	12,5	—
N. 202	29,3	80,5	++	30,5	18,2	—	23,2	68,9	+	26,5	18,5	—	33,8	22,9	—	27,5	22,0	—	27,0	37,5	—	41,8	17,5	—

TABELLA 1

ANALISI CHIMICHE SULLE PELLI ADOPERATE

PELLI PACKERS AMERICANE SALATE							
	Umidità	Sostanza dermica	Grasso	Ceneri	Pelo	Sale	Sostanze indeterminate
1° lotto	33,98	31,92	13,99	13,19	4,12	12,61	2,80
2° »	37,59	29,35	12,90	14,97	3,95	13,91	1,24
3° »	32,92	33,02	10,07	18,32	4,32	16,21	1,35
4° »	32,34	31,50	13,69	15,48	4,75	14,12	2,24
5° »	37,39	32,19	6,07	17,48	4,50	15,28	2,37
6° »	33,79	34,06	7,37	18,32	4,41	15,33	2,05
7° »	34,34	33,63	8,47	15,43	5,01	13,67	3,12
8° »	37,34	32,10	6,93	14,81	4,80	12,14	4,02
9° »	38,78	31,87	7,89	12,79	4,92	10,93	3,75
Media	35,386	32,182	9,709	15,643	4,531	13,81	2,549

PELLI BOVINE NOSTRANE SALATE							
	Umidità	Sostanza dermica	Grasso	Ceneri	Pelo	Sale	Sostanze indeterminate
Groppone	45,08	32,0	0,66	15,61	1,80	15,16	6,95
	43,39	33,55	0,60	14,91	2,08	14,49	5,47
	44,85	32,50	0,69	14,19	1,88	13,68	5,89
Collo con testa	48,13	28,45	0,71	15,54	1,64	15,09	5,53
	44,0	30,05	0,78	14,37	1,95	13,98	8,85
	46,58	29,40	0,78	14,10	1,65	13,65	7,49
Fianchi	45,66	26,06	1,05	16,50	4,01	16,10	6,72
	45,60	24,48	0,95	16,68	4,05	16,20	8,24
	44,70	25,15	1,15	15,86	3,95	15,20	9,19
Media	45,332	29,071	0,819	15,306	2,557	14,84	6,915

TABELLA 4

INFLUENZA DEL NaCl TRATTATO CON SOSTANZE DIVERSE SULLA CRESCITA DEI GERMI

Ceppi	VALORI DELLA TRASMISSIONE A 605 mμ						Nota
	Dimetil-ditiocar-bammato di zinco	Clorito sodico	Borato di zinco	Solfato mercu-roso	Clori-drato di chinina	Sulfatia-zolo	
N. 13	103	91	133	152	173	147	E' stato fatto eguale a 100 il valore della trasmissione in brodo-sale, dopo crescita mi-crobica al 14° giorno.
N. 14	114	98	115	126	158	146	
N. 17	113	87	128	153	176	139	
N. 81	107	86	135	153	172	147	
N. 82	98	80	135	149	170	136	
N. 105	102	83	129	150	170	135	
N. 136	127	105	138	150	173	144	
N. 150	118	85	129	154	172	146	
N. 157	116	101	145	156	174	139	
N. 185	105	83	134	145	167	140	
N. 202	115	90	140	153	170	144	

TABELLA 3

INFLUENZA DI COMPOSTI OLIGODINAMICI SULLA CRESCITA DEI GERMI

Ceppi	COMPOSTI									Nota
	Carbonato di cerio (oso)	Pentossido di vanadio	Ossido di torio	Carbonato di berillio	Triossido di antimonio	Solfato di tallio	Nitrato di stronzio	Nitrato di cadmio	Carbonato di litio	
N. 13	88,7	62,3	87,0	79,6	92,8	100,8	95,7	88,3	96,3	I valori della influenza (espressa in %) dei composti oligodinamici aggiunti al substrato-base (brodo-sale), sono stati ottenuti facendo eguale a 100 il risultato della prova in bianco (solo brodo-sale).
N. 14	95,6	65,9	88,7	89,7	104,6	111,4	100,0	89,8	90,4	
N. 17	90,0	56,4	90,7	54,9	49,0	61,7	63,6	87,3	94,8	
N. 81	85,5	55,3	95,0	84,0	—	107,4	98,2	68,9	91,3	
N. 82	99,1	69,1	109,1	100,1	61,0	83,4	85,5	66,5	103,3	
N. 105	100,2	88,7	96,2	89,0	66,9	111,6	101,9	76,9	105,2	
N. 136	92,4	59,3	94,0	67,8	52,6	89,8	80,8	53,2	85,5	
N. 150	64,0	45,8	49,8	62,5	65,6	57,4	47,5	49,8	51,2	
N. 157	86,8	59,6	54,2	60,9	52,7	76,6	52,4	47,7	54,9	
N. 185	105,6	69,3	83,1	92,7	97,0	89,6	73,1	61,7	90,6	
N. 202	69,9	55,7	67,0	68,0	58,3	63,2	56,1	55,5	51,4	

TABELLA 6

CARATTERISTICHE DEL PIGMENTO DEGLI ALOFILI CROMOGENI ED INFLUENZA DELLE RADIAZIONI LUMINOSE SULLA CROMOGENESI

Ceppi	Intensità di colorazione del pigmento rosso	Densità ottica dell'estratto metanolico del pigmento	Solvente	Solubilità a freddo	Solubilità a caldo	Solvente	λ max (in mμ)	Radiazioni in mμ dei filtri impiegati (1)	Intensità delle radiazioni in microampere	Colore della luce	D. O. dell'estratto	Intensità colorazione %
N. 13	+	0,0572	Acqua	——	——	Metanolo	462 - 495 - 528	O.C.(*)		—	0,0352	44,6
N. 14	++	0,1550	Etere di petrolio	±——	+——	Etanolo	463 - 494 - 530	L.N.(**)		—	0,0790	100,0
N. 17	+++	0,2240	Etere etilico	+++	+++	Cloroformio	476 - 506 - 544	L.P.(***)		—	0,1120	141,8
N. 81	+++	0,2071	Benzene	+++	+++	Esano normale	462 - 488 - 515	600-800	5,0	rosso	0,1690	214,0
N. 82	++	0,1575	Cloroformio	++—	+++	Solfuro di carbonio	495 - 530 - 572	500-700	67,0	giallo-arancione	0,1580	200,0
N. 105	++	0,1790	Solfuro di carbonio	++—	+++	Etere etilico	464 - 494 - 530	450-600	32,0	verde	0,1153	144,7
N. 136	+++	0,2650	Esano normale	++—	+++			350-550	60,0	azzurro	0,0900	113,9
N. 150	+	0,0750	Alcool etilico	+++	+++			330-450	0,6	indaco	0,0695	88,0
N. 157	++	0,1600	» metilico	+++	+++			320-430	0,3	violetto	0,0440	55,7
N. 185	+	0,0515	» isopropilico	+++	+++							
N. 202	+	0,465	» isoamilico	+++	+++							
			Acetone	+++	+++							

Nota: (1) Accoppiamento di filtri colorati e lampada Osram Ultravitalux da 300 W.
(*) Oscurità completa, ottenuta schermando perfettamente la finestra della Cella climatica Brabender.
(**) Luce naturale diurna e notturna, coltivando i ceppi in erlenmeyer immersi in bagnomaria termostatato, esposto su un terrazzo.
(***) Luce piena, ottenuta con l'impiego della sola lampada solare Osram Ultravitalux senza alcun filtro.

TABELLA 5

SVILUPPO MICROBICO E CARATTERISTICHE DELLE PATINE APIGMENTATE

Ceppi	Sviluppo microbico			Colorazione delle patine						Nota
				al 15° giorno			al 40° giorno			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
N. 13	89,7-21,0	93,2-19,5	98,2-19,5	rp	r	rs	a	j	j	1 = terreno nutritivo: decotto di pappa di patata salata; temperatura di incubazione: 37°C.; umidità relativa ambiente: 75%; tensione: pressione atmosferica normale; letture spettrofotometriche al tempo 0 e al 12° giorno (valori della trasmissione). 2 = come in 1, ma in aerobiosi relativa con una tensione di 15,30 mg di O_2 per litro. 3 = come in 1, ma con una pressione di 0,1 atm. di O_2 sterile. r = rosa; rs = rossa; rp = rosso-porpora; a = ambra; j = jalina; rj = rosa-jalina.
N. 14	93,4-36,1	90,8-37,5	95,4-11,0	r	r	r	j	j	j	
N. 17	98,5-23,7	97,4-28,6	99,1-16,4	rs	r	rs	a	a	rj	
N. 81	99,2-38,4	95,6-29,1	89,4-10,2	rp	rs	rs	j	r	rj	
N. 82	93,0-22,1	98,5-30,4	94,3-37,4	rs	rs	r	r	rj	j	
N. 105	96,5-19,4	91,9-25,3	89,7-13,4	r	rs	rp	j	r	j	
N. 136	89,2-14,6	97,5-17,9	96,6-18,5	rs	rs	rs	rj	r	j	
N. 150	100,0-33,9	99,1-24,6	89,9-22,1	rp	r	rs	j	j	rj	
N. 157	99,1-34,5	89,7-16,2	99,3-19,4	r	rp	rs	a	a	j	
N. 185	89,9-26,4	98,3-13,7	87,6- 9,2	r	r	r	a	j	j	
N. 202	100,0-23,1	99,4-21,8	98,9-13,4	r	r	rp	a	j	rj	