

Ricerche sui fermenti lattici

Dott. I. Politi

(Ricevuto il 20 Maggio 1940)

NOTA I

STUDIO E RIFERIMENTO SISTEMATICO DEI BATTERI ACIDIFICANTI DEI FORAGGI INSILATI

Le azioni fermentative determinate dai fermenti lattici interessano non soltanto da un punto di vista strettamente scientifico, ma anche ed in ispecial modo da quello applicativo. Questi microrganismi infatti intervengono attivamente in svariatissimi processi di fermentazione, spontanei o industriali, di sostanze d'origine animale (industria lattiera e casearia) e più ancora d'origine vegetale (conservazione di ortaggi e foraggi, industria enologica e birraria, fermentazione di mosti amilacei, ecc.) nonchè nella complessa fermentazione che si svolge nell'intestino dell'uomo e degli animali.

Il complesso argomento è stato ampiamente investigato; però è d'uopo riconoscere che le nostre conoscenze al riguardo sono largamente incomplete. Le ricerche compiute hanno infatti incontrato sempre non lievi difficoltà, soprattutto in conseguenza della grande varietà delle forme di cui consta il gruppo dei microrganismi produttori di acido lattico. A ciò ed anche alla mancanza di un criterio sufficientemente uniforme è dovuta pure la grande disformità di denominazioni e di classificazioni che per molto tempo ha reso particolarmente incerta l'identificazione specifica dei vari fermenti lattici. Una parte cospicua di codeste difficoltà può considerarsi ora superata specialmente in virtù degli studi di Orla Jensen, la cui classificazione è stata accettata da quasi tutti gli studiosi. Tuttavia il vasto e complesso argomento dei fermenti lattici attende di essere ulteriormente investigato, coordinando ed integrando le attuali conoscenze che, come si è detto, sono assai incerte ed incomplete. A queste finalità mira una serie di ricerche iniziate alla nostra Stazione e con la presente nota vengono esposti i risultati di un primo nucleo di indagini concernenti i microrganismi acidificanti dei foraggi insilati. L'incompletezza delle ricerche precedentemente compiute su questo particolare argomento, nonchè l'utilità di estendere le nostre conoscenze in merito ai processi fermentativi delle sostanze vegetali in genere, hanno costituito lo scopo particolare dello studio di cui segue l'esposizione, il quale si ricollega alle indagini sulla conservazione dei foraggi recentemente compiute (1). Infatti, l'esame batteriologico di numerosi foraggi insilati, prove di fermentazione in microsili ed esperienze di insilamento ci hanno offerto la possibilità di effettuare un buon numero di isolamenti e quindi di ottenere in coltura pura i più tipici batteri che presiedono alla complessa fermentazione acida dei foraggi.

Gli isolamenti vennero effettuati utilizzando le stesse piastre, di agar comune, di agar glucosato o di agar malto, allestite per la determinazione del contenuto batterico totale dei materiali in esame; gli isolamenti vennero cioè

effettuati senza preventivi arricchimenti e ciò al fine di poter isolare il maggior numero possibile di ceppi, diversi fra loro e nel medesimo tempo rappresentativi della microflora acidificante tipica dei foraggi. Per essere maggiormente certi della purezza delle colture così ottenute, per ciascun ceppo venne ripetuto l'isolamento mediante l'allestimento di nuove piastre. Si raccolsero così 28 ceppi che vennero mantenuti vivi mediante periodici trapianti in brodo malto e dopo alcuni mesi sottoposti a studio; alcuni di essi sono apparsi affatto simili e perciò nelle pagine che seguono sono descritte solamente le dodici forme risultate diverse fra di loro per qualche carattere ben evidente.

CARATTERI MORFOLOGICI

L'aspetto microscopico dei singoli ceppi è risultato notevolmente diverso a seconda del terreno impiegato, dell'età della coltura e di altre condizioni. È stato però agevole constatare che nelle condizioni di crescita più favorevoli (colture in infuso d'erba) la grossezza dei germi era di regola maggiore di quella osservata in altri terreni; questa differenza è apparsa più accentuata per i ceppi 13 T, 14 B, SP, 14; viceversa, in condizioni meno favorevoli, si osservavano forme più sottili, mentre il ceppo 14 ed in minor misura il 20 e l'MP presentavano pure delle forme filamentose.

Nei preparati colorati ottenuti da colture in infuso d'erba, le cellule microbiche di tutti i ceppi studiati apparvero circondate da un alone incolore (capsula mucosa); analoga osservazione, per quanto meno evidente, fu fatta anche in preparati ottenuti da colture in altri terreni.

In tutti i ceppi studiati, ad eccezione del 12 M, venne osservata la disposizione in catene, però con differenze più o meno accentuate, ma non nette, fra i singoli ceppi; codeste differenze concernono sia la suddetta disposizione in catene nei vari terreni colturali, sia anche la lunghezza e la forma delle catene medesime.

Tutti i ceppi studiati risultarono asporigeni, gram-positivi e di regola ben colorabili con i comuni colori di anilina.

I caratteri particolari dei singoli ceppi possono essere così riassunti:

Ceppo 12 M - Cocchi per lo più riuniti a due a due od a tetradì, di 0,7- 0,9 μ di diametro.

Ceppo CP - Cocchi ovali di 0,6 x 0,5- 0,7 μ per lo più a due a due o in catene di varia lunghezza; in brodo glucosato sono disposti in ammassi irregolari.

Ceppo 13 T - Si colora assai male col bleu di metilene e col bleu di Liiffier. Aspetto morfologico molto diverso a seconda del terreno colturale. In brodo malto ed in infuso d'erba: catene lunghe e curve, formate da elementi di 1-2 x 0,6-0,8 μ , eccezionalmente più lunghi (sino a 6-8- μ), assai spesso in catene molto incurvate ed aggrovigliate, costituite da elementi corti, con l'aspetto di streptococchi ovali.

In latte e siero di latte: esili bastoncini di 1 - 2 x 0,3- 0,4 μ isolati, a due a due, o in catenelle.

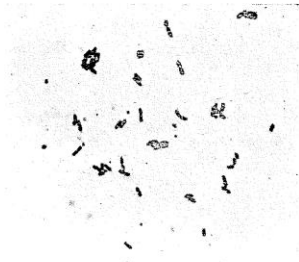
In brodo glucosato: catene più o meno lunghe e variamente incurvate costituite da elementi di 0,7- 0,9 x 0,6 μ , simili a streptococchi ovali. In agar-brodo glucosato alto strato (coltura per diffusione): bastoncini di 1-1,5 x circa 0,5 μ .



Ceppo 12 M. Coltura in brodo
malto. Ingrand. 850 diam.



Ceppo CP. Coltura in brodo malto.
Ingrand. 850 diam.



Ceppo 13 T. Coltura in agar gluco-
sato alto strato. Ingrand. 850 diam.



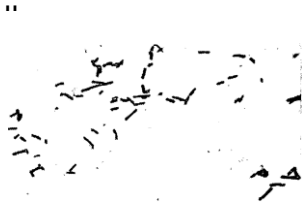
Ceppo 13 B. Coltura in brodo
malto. Ingrand. 850 diam.



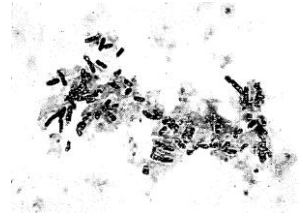
Ceppo 14 B. Coltura in infuso
d'erba. Ingrand. 1050 diam.



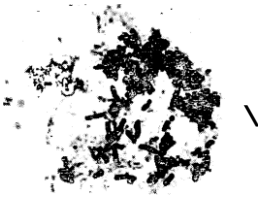
Ceppo SP. Coltura per striscio su
agar glucosato. Ingrand. 760 diam.



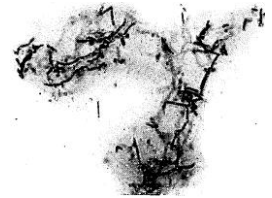
Ceppo MP. Coltura in brodo malto.
Ingrand. 850 diam.



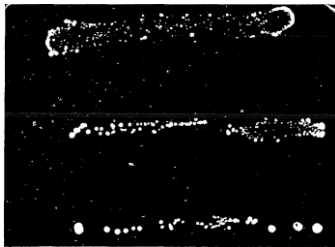
Ceppo 4. Coltura in infuso d'erba.
Ingrand. 1050 diam.



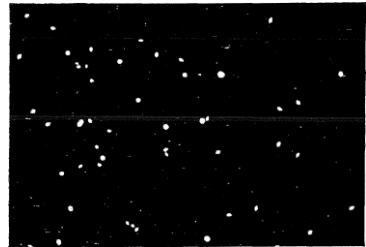
Ceppo 14. Coltura in infuso d'erba.
Ingrand. 1050 diam.



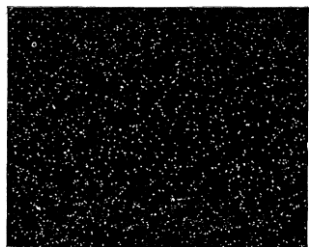
Ceppo 14. Coltura in brodo malto.
Ingrand. 1050 diam.



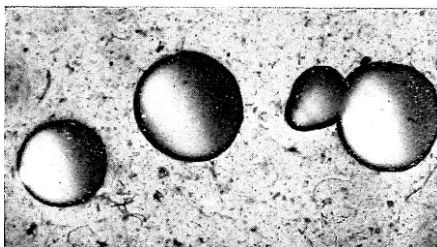
Ceppo SP. Striscio su agar glucosato.



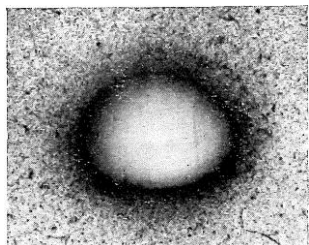
Ceppo SP. Coltura per diffusione in agar glucosato.



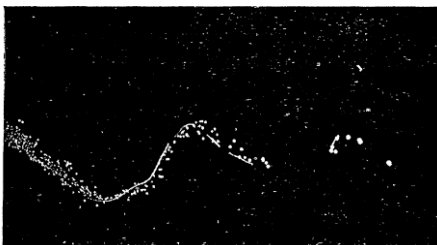
Ceppo SP. Coltura per diffusione in agar glucosato.



Ceppo 14 B. Colonie superficiali su agar glucosato.



Ceppo 14 B. Colonia in agar glucosato. Coltura per diffusione.



Ceppo 14. Striscio su agar glucosato.

Ceppo 6 B - Batteri di $1-2,5 \times 0,5-0,7 \mu$, per lo più disposti in catene.

Ceppo 13 B - Batteri di $1-3 \times 0,6-0,7 \mu$, isolati o in catene.

Ceppo 12 B - Simile al precedente.

Ceppo 14 B - Batteri di $1-3 \times 0,6-0,9 \mu$, con estremità arrotondate; isolati, a due a due, oppure in brevi catene. Nelle colture in infuso d'erba spesso si osservano lunghe catene formate da elementi per lo più di $1,2-1,8 \times$ circa $0,8 \mu$, ma non mancano forme lunghe sino a $6-8 \mu$.

Ceppo SP - Batteri di $1-2,5 \times 0,4-0,7 \mu$, con estremità arrotondate, per lo più isolati ed eccezionalmente in brevi catene.

Ceppo MP - Batteri di $1-3 \times 0,4-0,6 \mu$, per lo più isolati, talvolta in filamenti, di rado in corte catene.

Ceppo 4 - Batteri di $1-3 \times 0,5-0,7 \mu$ talvolta isolati o in brevi catene, ma spesso in catene lunghe ed incurvate.

Ceppo 20 - Batteri di $1-2,5 \times 0,4-0,6 \mu$, isolati o in brevi catene; qualche volta in filamenti.

Ceppo 14- In condizioni favorevoli di crescita (colture in infuso d'erba): batteri per lo più di $1-2 \times 0,6-0,7 \mu$, isolati o in brevi catene.

In condizioni poco favorevoli: esili batteri di varia lunghezza assai spesso in lunghi filamenti, della grossezza di 0,3- 0,4 μ .

I suesposti caratteri morfologici consentono di differenziare nettamente come micrococco il ceppo 12M, come diplo-streptococco il ceppo CP e come forme batteriche i rimanenti ceppi.

CARATTERI COLTURALI E FISIOLGICI

Temperatura ottima — Ad eccezione del Ceppo 13 T che ha il più rapido sviluppo a 40-45°, la temperatura più favorevole è compresa fra 30 e 37°; lento sviluppo si ha anche a 15°, mentre a 45° la crescita è scarsa o nulla. Il riscaldamento a 55-60° riesce mortale già dopo 10-20'.

Acidità del mezzo colturale — Tutti i ceppi studiati crescono meglio nei liquidi leggermente acidi, trovando le migliori condizioni per valori del pH compresi fra 5,5 e 6,5. Come sarà detto più ampiamente in seguito, i microrganismi medesimi acidificano nettamente, non soltanto in terreni con zuccheri, ma anche in liquidi privi di queste sostanze. Nessuno di essi produce indolo e così pure per alcuno di essi è stata constatata la produzione di catalasi.

Nessuno dei ceppi studiati si sviluppa in terreni sintetici, a base di sole sostanze minerali, anche se aggiunti di zuccheri. Il loro comportamento nei terreni complessi, alla temperatura di 37°, è il seguente:

Brodo di carne (non alcalinizzato; pH = 6,3) — Sviluppo abbastanza pronto ma non molto abbondante; il liquido rimane torbido più a lungo che negli altri terreni contenenti zuccheri, dando un deposito che per agitazione si sospende uniformemente.

Brodo Liebig (pH = 6,7) — Sviluppo un po' più scarso e più lento che nel brodo di carne, specialmente per i ceppi meno attivi.

Brodo Liebig-glucosio 2 % (pH = 6,7) — Lo sviluppo è più o meno pronto a seconda dei ceppi; il liquido diviene intensamente acido, intorbida fortemente, forma un abbondante deposito e ridiviene limpido; il deposito per agitazione si sospende uniformemente. Più lento degli altri è lo sviluppo dei ceppi 12 B, 20, 14 e 4.

Acqua peptonata — Non crescono i ceppi 20, 14 e 4; piuttosto lento e scarso è lo sviluppo degli altri.

Siero di latte — Il solo ceppo 13 T cresce con discreta rapidità; assai lento e scarso è lo sviluppo degli altri ceppi.

Latte — Non coagulano, nemmeno dopo 20 giorni, acidificando leggermente o non, i ceppi 20, 14, 4, MP, 12 B; non coagulano che dopo 15-20 giorni i ceppi SP, 12M, CP; coagulano dopo 7-10 giorni i ceppi 14 B e 13 B; coagula dopo 2-3 giorni il solo 13 T.

Acqua lievito — Pronto sviluppo di tutti i ceppi con intorbidamento più o meno persistente e deposito finemente granuloso. Nello stesso terreno con l'1% di glucosio lo sviluppo risulta più abbondante.

Brodo Malto — Buon sviluppo da parte di tutti i ceppi; più lenta è la crescita dei ceppi 20, 14 e 4. Il liquido acidifica fortemente, ed al 2°-3° giorno ritorna perfettamente limpido per la formazione di un precipitato granuloso o leggermente fioccoso che per agitazione si sospende uniformemente.

Infuso d'erba — Sviluppo assai pronto con intensa acidificazione, forte intorbidamento e formazione di assai abbondante deposito¹⁾. È questo il terreno nel quale tutti i ceppi studiati crescono meglio e ciò sta a dimostrare che essi trovano nei succhi vegetali le più favorevoli condizioni di sviluppo.

COLTURE PER STRISCIO (Semina da malto coltura)

Agar comune — Scarso sviluppo di tutti i ceppi, con colonie staccate e puntiformi; quasi nullo è quello dei ceppi 13 T, MP e 20.

Agar-brodo glucosato — I ceppi 13 T, MP, 20, 14 e 4 danno una patina molto scarsa con colonie staccate e puntiformi; gli altri invece si sviluppano bene o abbastanza bene dando una patina bianco-grigiastra, granulosa, umida, piuttosto brillante, formata da colonie più o meno staccate e rilevate.

Agar-malto — Anche in questo terreno si osserva un comportamento analogo al precedente.

Agar-infuso d'erba — Lo sviluppo è più abbondante che in agar-brodo glucosato ed agar malto. Anche i ceppi che in questi due terreni crescono stentatamente, su agar all'infuso d'erba presentano uno sviluppo più pronto ed intenso, dando come gli altri una patina granulosa, umida con colonie rilevate e più o meno staccate.

COLTURE PER INFISSIONE (Semina da malto colture)

Agar comune — Tutti i ceppi si sviluppano scarsamente, però in modo uniforme lungo tutta la linea d'inoculazione.

Agar-brodo glucosato — Tutti i ceppi, ad eccezione dell' MP che ha assai scarso sviluppo, crescono bene lungo tutta la linea d'inoculazione, intorbidando fortemente l'agar. Scarso sviluppo in superficie.

Agar-malto — Il comportamento è analogo a quello del terreno precedente, ma senza l'intorbidamento del substrato.

Gelatina comune — Non crescono i ceppi 14 e 4; gli altri danno piccole colonie rotondeggianti, lisce, più o meno staccate. Nessuno di essi fluidifica la gelatina; in gelatina glucosata il comportamento è analogo, salvo la maggior grossezza delle colonie.

COLTURE PER DIFFUSIONE IN SCATOLE PETRI

Agar comune — Dopo almeno 2-3 giorni tutti i ceppi danno colonie assai piccole, rotondeggianti, bianco-grigiastre a superficie liscia.

¹⁾ L'infuso dev'essere di recente preparazione, altrimenti lo sviluppo risulta sensibilmente ritardato.

Agar-brodo glucosato — In questo terreno i ceppi 4, 13 T e MP danno colonie piccolissime per lo più rotondeggianti e visibili solo con una buona lente od al microscopio; gli altri danno invece colonie globose o discoidali, con margini lisci di diametro sino ad 1 mm. o poco più. Ad eccezione del ceppo 20 si osserva un forte intorbidamento dell'agar circostante alle singole colonie, se queste son rade, e dell'intera piastra se queste son sufficientemente vicine.

Agar-malto — Non crescono i ceppi 13 T e MP. Gli altri si comportano come in agar glucosato, ma senza intorbidare l'agar.

Dalla precedente descrizione è agevole rilevare che dal punto di vista colturale i ceppi SP, 14 B, 12 B, 13 B, 6 B, CP e 12M presentano un comportamento alquanto simile; da essi si scostano gli altri ceppi per alcuni importanti caratteri e precisamente:

— Il ceppo 13 T per l'optimum di temperatura (40 - 45°), per qualche differenza di sviluppo nei terreni solidi, oltre che per la più rapida e intensa crescita ed acidificazione in latte;

— Il ceppo MP per le differenti caratteristiche di sviluppo nei terreni solidi;

— I ceppi 20, 14 e 4, i quali presentano uno sviluppo più stentato degli altri in tutti i terreni, non crescono in acqua peptonata e, tranne il 20, nemmeno in gelatina.

Da quanto precede emerge inoltre che tutti i ceppi studiati rispondono alle seguenti caratteristiche fondamentali:

Assenza di spore.

Gram-positività.

Mancanza di potere fluidificante per la gelatina.

Intensa produzione di acidi nei terreni provvisti di zuccheri.

Sviluppo in profondità nei terreni solidi.

Nessuna produzione di indolo.

Ne deriva che i microrganismi medesimi possono essere riferiti, secondo la nomenclatura di Orla Jensen, al gruppo dei fermenti lattici veri.

Un'importante caratteristica comune a tutti i ceppi descritti è che essi trovano le migliori condizioni di sviluppo nei terreni a base di sostanze vegetali (infuso d'erba, brodo malto, acqua lievito); essi crescono bene anche nel brodo glucosato, ma ad eccezione del 13 T, crescono assai lentamente nel latte. Si arriva così, e sin da questo momento, alla conclusione che nessuno dei ceppi studiati è da identificarsi con i comuni fermenti lattici (streptococchi e lattobacilli tipo *Bulgaricus*) che trovano le migliori condizioni di sviluppo nel latte.

FERMENTAZIONE DEGLI IDRATI DI CARBONIO

Tutti i ceppi studiati sono apparsi dotati di energico potere acidificante, non solo in presenza di idrati di carbonio, ma anche in terreni privi di queste sostanze, nei quali si sono osservate delle diminuzioni più o meno accentuate, ma sempre ben evidenti, nel valore del pH. In brodo di carne, ad esempio, dal valore iniziale di 6,3, il pH ebbe a diminuire a 5-5,3, senza

notevoli differenze da ceppo a ceppo; in acqua peptonata si sono invece osservate variazioni diverse a seconda dei ceppi. Il significato fisiologico di questi fenomeni, evidentemente alimentati da sostanze azotate, sfuggono per ora ad una attendibile spiegazione; il loro svolgersi rese però necessario il tenerne conto nelle prove di fermentazione dei diversi idrati di carbonio, istituendo per ogni ceppo una prova di controllo.

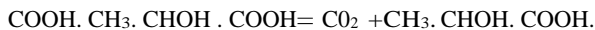
Il potere fermentativo venne studiato mediante coltura in acqua peptonata a pH = 6,5 - 6,7; per i ceppi 14, 4, 20, che non crescono in questo terreno, anche se addizionato di zuccheri, venne impiegato il brodo comune a base di estratto Liebig. Le prove di fermentazione vennero compiute in provette contenenti 10 cc di acqua peptonata o brodo, cui venne aggiunto sterilmente un cc di soluzione sterile al 10% dei vari zuccheri e quindi una goccia di coltura recente in brodo malto.

La produzione di acidi venne accertata mediante determinazioni del pH dopo 6-7 giorni di sviluppo a 37°. Tutti i ceppi risultarono capaci di fermentare: glucosio, levulosio, galattosio, maltosio, arabinosio. L'azione sugli altri zuccheri è apparsa variabile da ceppo a ceppo; le differenze riscontrate sono riassunte nelle tabelle I e II, dalle quali è agevole rilevare che il saccarosio è fermentato attivamente dai ceppi SP, MP, CP, 14 B, 13 B, 4 e 13 T; le acidificazioni riscontrate per gli altri cinque ceppi sono più o meno esigue.

Rilievi analoghi possono essere fatti per gli altri idrati di carbonio: nei riguardi del lattosio, hanno manifestato una netta azione fermentativa i ceppi SP, 14B, BB, 13T; lieve è l'azione dei ceppi MP, 12M e CP, mentre affatto inattivi sono risultati gli altri cinque ceppi. Hanno presentato un energico potere fermentativo per lo xilosio i ceppi SP, MP e CP; lieve l'azione dei ceppi 13 B e 12 B e praticamente nulla quella dei rimanenti.

È agevole anche osservare che quasi tutti i ceppi attaccano, sebbene con diversa intensità, la mannite e la glicerina.

Accanto alle suddette prove di fermentazione venne indagata l'azione sugli acidi tartarico, malico e citrico. È così emerso che nessuno dei ceppi attacca l'acido tartarico; il solo 13 T fermenta l'acido citrico, mentre buona parte di essi fermenta: l'acido malico. Queste azioni fermentative hanno luogo con una diminuzione di acidità e per l'acido malico molto probabilmente secondo l'equazione:



Cioè con l'andamento della nota fermentazione malolattica.

PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE ACIDA

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

TABELLA I — POTERE FERMENTATIVO

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

+ = Fermentazione decisamente positiva
 (+) = Fermentazione debole
 - = Fermentazione decisamente negativa
 (-) = Fermentazione dubbia
 ? = Fermentazione dubbia
 | = Nessuna fermentazione

TABELLA II — CARATTERI DIFFERENZIALI

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

differenza quelli fermentati, e parallelamente gli acidi totali e volatili prodotti. I risultati ottenuti possono essere riassunti nel seguente modo:

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

PRODUZIONE DI GAS

Questo carattere venne dapprima studiato mediante colture in acqua peptonata-glucosio 1 %, utilizzando il noto dispositivo di Durham; per nessun ceppo si ebbe però raccolta di gas nel tubicino. Le ricerche precedentemente esposte sul rendimento in acidi nella fermentazione del glucosio e del levulosio fecero però sorgere il dubbio che alcuni ceppi dessero effettivamente una notevole quantità di gas, probabilmente anidride carbonica, non rivelata dalle suddette prove. Queste vennero perciò ripetute coltivando i germi in brodo glucosato, e mantenendo i tubi di fermentazione in apparecchio per colture anaerobiche a ridotta pressione d'aria. Mediante questo accorgimento, che conferisce una grande sensibilità ai saggi di cui è cenno, rivelandosi così particolarmente adatto allo scopo, fu possibile constatare che i ceppi SP, MP e CP producono una notevole quantità di gas, mentre gli altri ceppi non ne producono o ne producono solo in piccolissima quantità. Alla stessa conclusione si pervenne anche mediante coltura in provette con tappo di paraffina.

Ponendo ora a confronto i suesposti risultati con quelli relativi alla capacità di fermentare i diversi idrati di carbonio, riesce facile constatare che i ceppi SP, MP e CP differiscono nettamente dagli altri sia perchè nella fermentazione del glucosio e del levulosio danno origine ad acidi volatili, a gas ed a sostanze non acide in rilevanti proporzioni, sia anche per la proprietà di fermentare assai attivamente lo xilosio. Si perviene così alla conclusione che i suddetti tre ceppi sono caratterizzati da un tipo di fermentazione nettamente diverso da quello degli altri 9 ceppi.

RIFERIMENTO SISTEMATICO

Al riferimento sistematico dei microrganismi descritti in precedenza è strettamente connesso il quesito di stabilire quali di essi sono riferibili alla medesima specie; per questa ragione conviene innanzi tutto coordinare tutte le osservazioni compiute, in modo da ordinare e raggruppare i ceppi stu-

diati e facilitare così i confronti necessari per la loro identificazione specifica. Ponendo a confronto tutti i risultati ottenuti, si nota facilmente che le differenziazioni basate rispettivamente sui caratteri morfologici, colturali e fermentativi non coincidono. Si osserva ad esempio che alcuni ceppi, come l'SP ed il 13 B, poco diversi dal punto di vista morfologico e soprattutto da quello colturale, sono nettamente diversi dal punto di vista del rispettivo tipo di fermentazione e d'altra parte ceppi che, come il 12 B e il 12M, presentano proprietà fermentative e caratteri colturali assai simili, ma differiscono nettamente dal punto di vista morfologico. Si osserva però che fra tutti i caratteri che furono oggetto di indagine un'importanza preminente spetta ai seguenti:

— il tipo di fermentazione, caratterizzato in primo luogo dalla natura e dalla proporzione dei prodotti che traggono origine dalla fermentazione medesima;

— l'optimum di temperatura;

— il comportamento nei vari substrati nutritivi, considerato nel suo complesso e cioè come l'espressione sintetica delle speciali esigenze nutritive che i comuni procedimenti di indagine non consentono di precisare in modo adeguato.

In base a codesti caratteri che, unitamente alle più importanti differenze morfologiche, vanno assunti come fondamentali e quindi in base agli altri caratteri osservati, i microrganismi studiati possono essere ordinati e raggruppati come nella tabella II.

CEPPI SP, MP, CP

I caratteri rilevati per il ceppo SP appaiono molto simili a quelli del *Lactobacillus pentoaceticus* Fred, Peterson e Davenport ¹⁾ (3); essi appaiono in pari tempo assai simili anche a quelli del *Bacillus brassicae fermentatae* Henneberg (4), come si è potuto constatare anche mediante un confronto sperimentale ²⁾. L'unica differenza notevole, emersa da questo confronto, concerne l'azione sul lattosio, verso il quale il *Bac. brassicae fermentatae* è affatto inattivo. Si fa osservare però che anche il ceppo SP non è un energico fermentatore di codesto zucchero, mentre scarsa o variabile è pure l'azione del *Lactobacillus pentoaceticus*. Specialmente importante è invece la somiglianza delle proprietà caratteristiche comuni ai suddetti microrganismi, vale a dire: l'intensa fermentazione dello xilosio, che è lo zucchero più intensamente fermentato; lo sviluppo di gas e la produzione di cospicue quantità di acido acetico; la fermentazione mannitica del levulosio. Le precedenti constatazioni si accordano perfettamente con i risultati di C. S. Pederson (5) che, in base allo studio comparativo di un grande numero di ceppi, considera come identici i seguenti Lactobacilli produttori di gas: *Betabacterium breve* Orla Jensen, *Bac. Brassicae fermentatae* Henneberg, *Lactobacillus pentoaceticus* Fred, Peterson e Davenport, *Bacillus panis fermentati* Henneberg,

¹⁾ La presenza di questo lattobacillo nei foraggi insilati venne già segnalata dai predetti autori e dal Virtanen.

²⁾ È stato impiegato a tal fine un ceppo del Lister Museum di Londra.

Lactobacillus lycopersici Mickle e probabilmente *Bacterium Soya* Saito e *Bacillus acidophil-aerogenes* Torrey e Rahe, che riunisce nella specie *Lactobacillus brevis* (Orla Jensen) Bergey et al.

Si può così concludere che il ceppo SP appartiene a questa stessa specie batterica.

La medesima conclusione è da ritenersi valida anche per il ceppo MP, nonostante le differenze che questo presenta rispetto al precedente; è agevole del resto riconoscere che non si tratta di differenze veramente importanti, essenzialmente relative allo sviluppo nei terreni solidi, mentre per il resto, e specialmente nei riguardi delle proprietà fermentative, venne osservata una grande somiglianza.

Anche per il ceppo CP potrebbe valere lo stesso riferimento sistematico se il germe medesimo, affatto simile all' SP come caratteri culturali e fermentativi, non differisse nettamente dal punto di vista morfologico; infatti, nelle numerose osservazioni compiute esso si presentò sempre in forme cocciche; e perciò, mantenendo al criterio morfologico quell'importanza sistematica che si è sempre affermata come fondamentale, non sembra logico riferire anche il ceppo CP alla specie *Lactobacillus brevis*. D'altra parte si osserva che per la proprietà di fermentare attivamente lo xilosio, per l'azione quasi nulla sul lattosio, per la fermentazione mannitica del levulosio ed in genere per un complesso di altri caratteri, il ceppo CP non riesce identificabile con alcuno dei cocchi lattici gasogeni descritti con sufficiente completezza da precedenti Autori. Esso si accosta al *Leuconostoc mesenteroides* (Cienkowski) van Tieghem; dal quale però differisce nettamente soprattutto perchè nei terreni zuccherati liquidi non forma masse gelatinose. E perciò molto probabilmente esso appartiene ad una specie non ancora descritta per la quale, in attesa di ulteriori precisazioni sperimentali ed in base alla nomenclatura di Bergey et al. crediamo di proporre la denominazione di *Leuconostoc herbarum* con la seguente diagnosi:

Cocchi ovali di 0,6 - 1 x 0,5 - 0,7 μ , per lo più a due a due o in brevi catene. Gram-positivi.

Infissione in gelatina: non fluidifica; lungo tutta la linea di inoculazione si formano piccole colonie rotondeggianti, bianco-grigiastre, più o meno staccate.

Agar comune striscio — Lievissima crescita di colonie puntiformi staccate.

Brodo comune — Scarso sviluppo.

Brodo saccarosato — Buon sviluppo con intorbidamento e formazione di deposito che per agitazione si sospende uniformemente.

Latte — Lenta acidificazione; coagulazione dopo 20 o più giorni.

Patata alla Roux — Nessuna crescita.

Non produce indolo.

Fermenta con produzione di acidi: glucosio, levulosio, galattosio, saccarosio, maltosio, xilosio, arabinosio, glicerina e più debolmente mannite e destrina. Quasi nulla è l'azione sul lattosio. Decompone l'acido malico, non l'acido citrico e tartarico. Produce gas e molti prodotti secondari. Nella fermentazione del levulosio dà mannite.

Microaerofilo.

Ottimo di temperatura 30-37°.

CEPPI 14 B, 13 B, 12 B; 6 B

Per il complesso dei loro caratteri questi quattro ceppi appaiono riferibili alla specie *Streptobacterium plantarum* Orla Tensen (*Lactobacillus plantarum* Bergey et al.)¹⁾. A questa conclusione si è pervenuti anche in base ad un confronto sperimentale all'uopo istituito²⁾. In realtà si è potuto constatare che dal punto di vista morfologico e colturale non si avevano differenze tali da lasciare dubbi su codesto riferimento; qualche differenza invece emergeva dal confronto dei caratteri fermentativi, come si rileva dal seguente prospetto:

| | Strep. plantarum | 14 B | 13 B | 12 B | 6 B |
|--------------------|------------------|------|------|------|-----|
| Saccaroso | + | + | + | ? | (+) |
| Lattosio | — | + | + | — | — |
| Arabinosio | + | + | + | + | (+) |
| Xilosio | — | — | (+) | (+) | — |

Nel recente studio di C. S. Pederson (6) è tuttavia dimostrato chiaramente quanto sia variabile il potere fermentativo dei batteri appartenenti alla specie *Lactobacillus plantarum* e come l'azione dei batteri medesimi sui singoli idrati di carbonio si esplichì in tutti i gradi, dall'assenza di potere fermentativo sino alla definita fermentazione positiva. Secondo il medesimo A. sono sinonimi, completi o in parte, di *Lactobacillus plantarum* i seguenti microrganismi: *Bacillus pabuli-acidi* II Weiss, *Bacillus cumumeris fermentati* Henneberg, *Bacillus Wortmanni* Henneberg, *Bacillus Listeri* Henneberg, *Bacillus Maerckeri* Henneberg, *Bacillus Leichmanni* II Henneberg, *Bacillus Beijerincki* Henneberg, *Lactobacillus pentosus* Fred, Peterson ed Anderson, *Lactobacillus arabinosus* Fred, Peterson ed Anderson e *Bacterium busae-asiaticae* Tschekan e probabilmente *Lactobacillus densus* Beijerinck e *Lactobacillus conglomeratus* Beijerinck.

CEPPI 20, 14, 4

Il confronto dei caratteri di questi tre ceppi con quelli del precedente gruppo mentre da un lato pone in evidenza un complesso di caratteristiche comuni, dall'altro consente di accertare delle differenze, notevoli sì, ma rappresentate essenzialmente da una crescita più stentata in tutti i terreni, dall'assenza di sviluppo in acqua peptonata e gelatina, nonché da azioni fermentative meno intense.

Anche nei riguardi dei caratteri morfologici si è potuto osservare che le differenze non appaiono notevoli se il confronto viene limitato alla forma e alle dimensioni che i microrganismi medesimi presentano nelle colture in infuso d'erba, cioè nel terreno più adatto al loro sviluppo.

Perciò sembra logico pensare che i tre ceppi qui considerati non siano in realtà molto diversi da quelli del precedente gruppo, ma piuttosto diffe-

¹⁾ La presenza di batteri di questa specie nei foraggi insilati è stata segnalata anche da Allen, Harrison, Wattson e Fergusson e da Van Beynun e Pette.

²⁾ Anche per questo confronto venne impiegato un ceppo del Lister Museum di Londra.

renziati dai medesimi essenzialmente per una spiccata attenuazione delle loro vitalità e delle loro azioni fermentative. D'altra parte è agevole riconoscere che i ceppi medesimi presentano un complesso di caratteri, propri della specie *Streptobacterium plantarum*, che li differenzia sicuramente da tutte le altre specie di lattobacilli comprese nella classificazione di Orla-Jensen.

È molto probabile quindi che anche i ceppi 20, 14 e 4 appartengano alla specie *Lactobacillus plantarum* (Orla Jensen) Bergey et al.

CEPPI 12 M

I caratteri colturali e fermentativi di questo ceppo sono risultati molto simili a quelli dei ceppi precedentemente riferiti alla specie *Lactobacillus plantarum* e specialmente a quelli del 12 B. Una netta differenza è invece data dai caratteri morfologici per i quali il ceppo 12 M deve essere riferito al gruppo dei micrococchi lattici; presentando tutte le caratteristiche dei fermenti lattici veri ed omofermentativi, esso però non risulta riferibile ad alcuna delle specie distinte da Orla Jensen, nella cui classificazione i micrococchi figurano solo fra i fermenti pseudolattici ¹⁾. Il ceppo medesimo si accosta invece ad alcuni micrococchi, noti come agenti della fermentazione malolattica del vino (*Micrococcus malolactitus* Seifert, *Micrococcus acido-vorax* e *Micrococcus Variococcus* Müller-Thurgau) o determinanti alterazioni della birra (*Pediococcus acidi lactici* Lindner, *Pediococcus damnosus* Clausen). Si può osservare in proposito che il ceppo 12 M, come del resto gran parte dei microrganismi descritti in questa nota, è capace di operare la fermentazione lattica dell'acido malico.

Rispetto ai detti micrococchi si notano però delle differenze più o meno notevoli, specialmente nei riguardi della temperatura ottima e del potere fermentativo come si può rilevare dal seguente prospetto:

| | Temperatura ottima | Maltosio | Sacca- rosio | Lattosio | Arabi- nosio | Xilosio |
|--|-----------------------|----------|-----------------|----------|-----------------|---------|
| <i>Pediococcus damnosus</i> | 25 | + | + | — | — | — |
| <i>Pediococcus acidi lactici</i> . . . | 38 | — | — | + | + | + |
| <i>Micrococcus malolacticus</i> . . . | 25-34 | | | | | |
| » <i>acidovorax</i> | 26,5 | + | — | + | — | — |
| » <i>variococcus</i> | 26,5 | — | — | — | — | — |
| Ceppo 12 M | 30-37 | + | ? | ? | + | ? |

D'altra parte si può osservare che si tratta di microrganismi isolati da materiali molto diversi ed anche sotto questo aspetto una identificazione del ceppo 12 M con i precedenti non sembra possibile. Perciò è molto probabile trattarsi di un micrococco diverso da quelli descritti dai precedenti Autori; in base alla nomenclatura di Bergey et al. crediamo quindi di proporre la denominazione di *Micrococcus pratensis* con la seguente diagnosi:

¹⁾ Osservazione analoga venne fatta da Mees e da Van Laer (1) nei riguardi dei pediococchi della birra.

Cocchi per lo più riuniti a due a due o a tetradi di 0,7 - 0,9 μ . Gram-positivi.

Infusione in gelatina — Non fluidifica; lungo tutta la linea d'inoculazione si formano piccole colonie rotondeggianti, bianco-grigiastre più o meno staccate.

Agar comune striscio — Lievissima crescita di colonie puntiformi staccate.

Brodo comune — Scarso sviluppo.

Latte — Acidifica leggermente ma senza coagulare nemmeno dopo 20 giorni.

Patata alla Roux — Nessuna crescita.

Non produce indolo.

Fermenta con produzione di acidi, ma senza apprezzabili quantità di gas, glucosio, levulosio, galattosio, maltosio, arabinosio, glicerina; debolmente destrina; quasi nulla è l'azione su saccarosio, lattosio, xilosio, mannite e amido.

Decompono l'acido malico, non gli acidi citrico e tartarico.

Microaerofilo.

Ottimo di temperatura 30-37°.

CEPPO 13 T

Questo ceppo differisce nettamente da tutti i precedenti in primo luogo per il più elevato optimum di temperatura; esso perciò appartiene al gruppo dei batteri lattici che si sviluppano più intensamente a 40-45° che non a temperature inferiori. Secondo la classificazione di Orla Jensen questo gruppo comprende le seguenti sei specie: *Thermobacterium cereale* (*Bacillus Delbrückii* Leichmann), *Th. lactis* (*Bacillus lactis acidi* Leichmann), *Th. helveticum* (*Bacterium casei* e *Freudenreich*), *Th. bulgaricum*, *Th. jugurt*, *Th. intestinale* (*Lactobacillus acidophilus*).

È agevole però osservare subito che il ceppo 13 T differisce da tutti questi microrganismi per la proprietà di fermentare l'arabinosio; e poichè la mancanza di potere fermentativo per questo zucchero è stata sinora ritenuta una caratteristica comune a tutti i termobatteri lattici, è chiaro che il ceppo medesimo non può essere riferito ad alcuna delle suddette specie. È impattante tuttavia estendere il confronto, al fine di chiarire meglio i rapporti di parentela e la posizione sistematica del germe considerato. Anche a prescindere dai caratteri morfologici, i quali del resto presentano differenze spesso piuttosto accentuate pure fra i ceppi di una medesima specie, il ceppo 13 T si stacca nettamente dalle due specie *Th. bulgaricum* e *jugurt*, principalmente per la crescita molto più lenta in latte e per il più vasto potere fermentativo; una più stretta parentela si osserva invece nei confronti del *Th. lactis* che al pari del ceppo 13 T ha la proprietà di fermentare il saccarosio ed il maltosio. Questa constatazione presenta un certo interesse in quanto il *Th. bulgaricum* ed il *Th. jugurt*, spiccatamente specializzati a fermentare il lattosio, hanno un habitat ben definito, il latte, in cui trovano le condizioni più favorevoli di sviluppo.

Il *Th. lactis* invece, pur essendo un componente della flora microbica del latte, non appare così strettamente specializzato; perciò sembra logico pensare che esso abbia in realtà un altro habitat naturale, forse il terreno

agrario, dal quale poverrebbe nel latte trasportato dai noti veicoli ed in modo speciale dai foraggi. Potrebbe così spiegarsi la maggior somiglianza di caratteri precedentemente riscontrata, essendo il ceppo 13 T un componente della flora microbica dei foraggi insilati. D'altra parte però si può osservare che questo ceppo si accosta anche al *Th. cereale*, specie microbica decisamente specializzata nelle fermentazioni di sostanze vegetali, costituita da germi i quali fermentano vigorosamente il saccarosio ed il maltosio, mentre sono inattivi o quasi sul lattosio e crescono assai male in latte; difatti anche il ceppo 13 T, pur sviluppandosi con discreta intensità in questo terreno, cresce assai meglio in quelli a base di sostanze vegetali.

In complesso quindi si può dire che il ceppo medesimo ha caratteri intermedi fra quelli delle due specie *Th. lactis* e *Th. cereale*; ma soprattutto per la singolare proprietà di fermentare attivamente l'arabinosio esso va riferito ad una specie diversa per la quale crediamo di proporre, secondo la nomenclatura di Bergey et al. la denominazione di *Lactobacillus sili* fornendo la seguente diagnosi:

Batteri per lo più in catene, frequentemente molto incurvate, formate da elementi di dimensioni assai varie (in brodo malto e infuso d'erba 1-2 x 0,6 - 0,8 μ , eccezionalmente più lunghi, spesso molto corti, simili a cocchi ovali; in latte bastoncini di 1 - 2 x 0,3 - 0,4 μ).

Infusione in gelatina — Non fluidifica; lungo tutta la linea d'inoculazione piccole colonie rotondeggianti, bianco grigiastre più o meno staccate.

Agar comune striscio — Lievissima crescita di poche colonie piccolissime appena visibili.

Brodo comune — Scarso sviluppo.

Latte — Acidifica coagulando dopo 2-4 giorni.

Patata alla Roux — Nessuna crescita.

Non produce indolo.

Fermenta con produzione di acidi e solo piccole quantità di altre sostanze: glucosio, levulosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, arabinosio, glicerina, mannite, e leggermente destrina. Non fermenta xilosio e amido.

Decompono l'acido citrico e l'acido malico, non l'acido tartarico.

Microaerofilo.

Ottimo di temperatura 40-45°.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

Da quanto è stato esposto nelle pagine che precedono si può dedurre che ai processi di acidificazione spontanea cui soggiacciono i foraggi presiede una complessa flora microbica, costituita principalmente da microrganismi appartenenti al gruppo dei fermenti lattici e riferibili a differenti generi e specie del gruppo medesimo. Accanto a germi, la cui presenza nei foraggi insilati venne già segnalata da precedenti autori e cioè appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* (Orla Jensen) Bergey et al., si è riscontrato l'intervento di microrganismi non identificabili con altri

descritti in precedenza e cioè un diplo-streptococco avente caratteri colturali e fermentativi assai simili a quelli del *Lactobacillus brevis*; un micrococco con i caratteri di fermento lattico vero ed omofermentativo; un termobatterio fermentante attivamente l'arabinosio. Per questi microrganismi si sono proposte rispettivamente le seguenti denominazioni:

Leuconostoc herbarum.

Micrococcus pratensis.

Lactobacillus sili.

Lo studio compiuto ha consentito inoltre di accertare che i germi descritti, nonostante le varie differenze che li contraddistinguono, presentano in comune un complesso di caratteri fisiologici che appaiono strettamente rispondenti alle caratteristiche del substrato dal quale vennero isolati. Questo complesso di caratteri si riferisce sia al comportamento nei vari terreni colturali sia alle loro proprietà fermentative. Infatti i germi studiati trovano le condizioni di sviluppo più favorevoli nei terreni a base di sostanze vegetali e principalmente nel succo e negli infusi d'erba; viceversa, più o meno stentata è la loro crescita nel latte. D'altra parte i germi medesimi fermentano per lo più attivamente gli zuccheri vegetali, producendo acidi oltre che dagli exosi, anche da saccarosio, maltosio e da arabinosio; alcuni di essi inoltre fermentano con grande vigore lo xilosio; nulla o debole è generalmente l'azione sul lattosio.

È agevole scorgere in tutto ciò la ben nota azione selettiva del substrato; ma non si può escludere tuttavia che in conseguenza delle speciali condizioni fisico-chimiche del substrato medesimo e per effetto della rapida ed intensa fermentazione che in esso si svolge, la singolare composizione della microflora acidificante dei foraggi insilati possa essere almeno in parte dovuta anche a fenomeni di adattamento e di variabilità dei caratteri microbici. Ciò infatti potrebbe spiegare alcune constatazioni emerse dalle ricerche compiute e cioè la presenza nei foraggi insilati di germi nettamente diversi dal punto di vista morfologico ma aventi caratteri colturali e proprietà fermentative molto simili; nonchè quella di germi ben poco diversi come comportamento colturale ma radicalmente differenziati dai rispettivi caratteri morfologici oppure dal tipo di fermentazione. Comunque è chiaro che la constatata correlazione fra i caratteri dei germi studiati e la natura del loro substrato consente di attribuire ai germi medesimi la qualifica proposta da Arnaud di *fermenti lattici dei vegetali*; qualifica che va intesa in duplice senso e cioè di microrganismi che fermentano energicamente gli zuccheri contenuti nei vegetali e di microrganismi che trovano condizioni elettive nei substrati a base di sostanze vegetali.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den angestellten Untersuchungen ergibt sich, dass an den spontanen Ansäuerungsprozessen im Silofutter hauptsächlich Keime von der Gruppe der Milchfermente beteiligt sind. Neben Keimen von der Art des *Lactobacillus plantarum* (Orla Jensen) Bergey et al. und des *Lactobacillus brevis* (Orla Jensen) Bergey et al. wurden drei Arten isoliert und studiert die mit den bisher

beschriebenen nicht zu identifizieren sind. Für diese letzteren werden folgende Bezeichnungen vorgeschlagen: *Leuconostoc herbarum*, *Micrococcus pratensis*, *Lactobacillus sili*.

RÉSUMÉ

De l'étude exécutée, il résulte qu'aux procès d'acidification spontanée des fourrages ensilés président des microorganismes référables au groupe des ferments lactiques. A côté de germes appartenant aux espèces *Lactobacillus plantarum* (Orla Jensen) Bergey et al. et *Lactobacillus brevis* (Orla Jensen) Bergey et al. on a isolé et étudié trois formes qui n'étaient pas identifiables avec les espèces décrites précédemment. Pour ces microorganismes on a proposé respectivement les dénominations suivantes: *Leuconostoc herbarum*, *Micrococcus pratensis* et *Lactobacillus sili*.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *I. Politi* - Ricerche sui foraggi insilati - Nota I, II, III (Annali della Sperimentazione Agraria, 1938, 29, pag. 75, 89, 95).
 - I. Politi* - *G. Pepoli* - Ricerche sui foraggi insilati - Nota IV - Ed. Biazzi - Milano, 1938.
 - C. Arnaudi* - Ricerche sui microorganismi acidificanti dei foraggi insilati (Atti R. Acc. dei Lincei 1938, 28, pag. 157).
 - (2) *Orla Jensen* - The lactic acid bacteria, Kopenhagen 1919.
 - (3) *Fred. Peterson, Davenport* - Journal of Biological Chemistry 1919, 29, pag. 346; 1919, 39, pag. 358; 1920, 42, pag. 175.
 - (4) *Henneberg* - Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien. P. Parey, Berlin 1903.
 - (5) *C. S. Pederson* - Journal of Bacteriology 1936, 31, pag. 217.
 - (6) *C. S. Pederson* - Journal of Bacteriology 1938, 35, pag. 95.
 - (7) *M. H. Van Laer* - Les troubles bacteriens de la bière. Annales des fermentations, 1937, 3, pag. 354.
 - (8) *G. De Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica, U.T.E.T., Torino 1927.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* - fifth edition. Baltimore 1939.
-