

Ricerche sulla microflora del siero-fermento del formaggio grana

IMPORTANZA DEL SIERO-FERMENTO NELLA FABBRICAZIONE
DEL FORMAGGIO GRANA E STUDI RIGUARDANTI IL SUO CON-
TENUTO MICROBICO

Paolo Renco

I. - Batteri del genere "Thermobacterium" Orla Jensen

Per siero-fermento o siero innesto s'intende il siero fermentato proveniente dalla lavorazione del grana, lasciato inacidire in speciali recipienti in modo da raggiungere, entro 20-22 ore circa, un dato grado di acidità, richiesta per la buona riuscita del formaggio.

Il siero-fermento, che ha fondamentale importanza nella fabbricazione del grana, viene aggiunto al latte in caldaia all'inizio della lavorazione. Se ben riuscito, presenta un'acidità che varia da circa 28 a 60° S.H. secondo il caseificio (oggi, generalmente, vengono superati i 40° S.H. e si lavora di preferenza con sieri fermenti di 50-56° S.H.) e può considerarsi come una cultura di fermenti lattici (che vi si trovano in ragione di parecchie centinaia di milioni per cc. superando non di rado il miliardo).

Il siero-fermento viene aggiunto, al latte in caldaia in ragione di tre litri circa per ogni 100 litri di latte. Questo forte innesto porta il numero dei microbi del latte in caldaia da un paio a qualche diecina di milioni, carica che risulta, per conseguenza, rappresentata essenzialmente dai termobatteri. In seguito le operazioni tecnologiche, applicate nella fabbricazione del grana, favoriscono in modo tale lo sviluppo di questi batteri da far loro prendere nel formaggio fresco una assoluta predominanza.

L'uso del siero-fermento è stato introdotto per la prima volta nella fabbricazione del formaggio grana verso il 1890, dopo alcuni anni di esperimenti fatti dal capo cascinaio Giuseppe Notari (1) (al quale va il principale merito per la sua diffusione e uso razionale), ma la prima pubblicazione in merito, si deve a P. Spallanzani (2) nel 1895. L'A. nell'intento di com-

(1) Giuseppe Notari - Stab. Tipograf. Artigianelli in Reggio E., 1937.

(2) P. Spallanzani: *L'inoculazione del siero-fermentato nella fabbricazione del grana. Le stazioni sperimentali agrarie italiane* - 1895, Vol. XXVIII, pag. 43.

battere il gonfiore, si era proposto di innestare il latte in caldaia con buoni fermenti lattici presenti nel siero di una lavorazione ben riuscita. Le prime prove furono eseguite con siero-fermento avente un'acidità di 13° S.H., acidità che però veniva parzialmente neutralizzata prima di aggiungere il siero nel latte in ragione del 5 %. I risultati furono realmente eccellenti, ma l'A., pur affermando che si tratta di una cultura di fermenti lattici purificati e selezionati, non fa cenno alle forme o specie microbiche presenti.

Nel 1905 il Fascetti riprendeva l'argomento con uno studio sistematico sulla natura, sulle funzioni, sulla flora microbica, sui criteri per la conservazione, controllo ed uso del siero-fermento. Il Fascetti giunse alla conclusione che il supremo fattore direttivo della fabbricazione del grana è il grado di acidità.

Quest'ultima può essere opportunamente regolata coll'aggiunta razionale del siero-fermento. Ma il siero-fermento, scrive il Pascetti (1), ha una funzione eminentemente fermentativa, sia influenzando la flora microbica durante la lavorazione, sia preparando l'ambiente chimico adatto nel formaggio perchè si inizi il regolare processo fermentativo.

L'A. ha studiato il siero-fermento soprattutto dal punto di vista tecnologico mentre, della sua composizione microbiologica, si è limitato a constatare che « il latte-siero residuo della fabbricazione del grana ben riuscito, tenuto alla temperatura di 30° C. per circa 20 ore, presenta sempre in predominio due forme di fermenti lattici: una varietà del *Bacterium lactis acidis* del Leichmann ed un bacillo lattico acidificante. A seconda della temperatura e della carica batterica che presenta il siero, appena fabbricato il formaggio, della forma del recipiente ove il siero si conserva e della durata del riposo, varia fortemente il numero dei microbi ed anche la proporzione delle due forme microbiche suaccennate, come il grado di acidità ». L'A. prosegue affermando che: « i migliori effetti del siero razionale fermentato e controllato si ottennero quando la proporzione dei due fermenti era pressochè uguale e quando l'acidità misurava da 12 a 13 gradi Soxhlet ». Le forme streptococciche predominano quando l'acidità è più bassa di 12-13° S.H., le bacillari quando è più alta.

Il Pascetti ha dimostrato che, coll'uso razionale di siero-fermento, si può prevenire in grandissima parte la comparsa dei difetti del formaggio grana, ottenendo nello stesso tempo un più regolare andamento maturativo.

In seguito agli studi suaccennati, l'uso del siero-fermento nella fabbricazione del grana si diffuse rapidamente ed oggi è universalmente adottato (2).

Qualche accenno nei riguardi della flora microbica del siero-fermento è fatto da Della Torre in uno studio sulla flora microbica del siero fresco (3)

(1) G. Fascetti: *Caseificio* - Manuale Hoepli, 1918.

(2) E' bene ricordare che prima dell'entrata in pratica l'uso del siero-fermento, si riteneva ben riuscita una partita di grana avente 50/60 % di « scelto », mentre dopo l'introduzione del siero-fermento lo scelto deve presentare non meno del 90 %.

(3) G. Dalla Torre: *La flora microbica del siero di formaggio grana*. - Annuario della R. Stazione Sperimentale di Caseificio di Lodi, 1919, pag. 59.

ed in un altro sulla flora microbica del formaggio grana (r). Nel primo lavoro, l'A. constata che la flora microbica del siero fresco è composta sostanzialmente dagli streptococchi, mentre i bastoncini sono piuttosto rari; nel siero-fermento invece predominano i bastoncini. Questi ultimi vengono divisi dall'A. in due gruppi: coagulanti (sicuramente rappresentati dai generi *Thermobacterium* o *Streptobacterium*, Orla Jensen) e gassogeno-coagulanti descritti dallo stesso A. in un altro lavoro (2).

Nello studio che tratta il contenuto microbico del grana l'A. si occupa brevemente della microflora di due campioni di siero-fermento. In uno dei campioni (acidità 34° S.H.), l'A. ha riscontrato 12.600.000 germi per cc., rappresentati nella maggior parte dai bastoncini lattici e principalmente da batteri simili al *Thermobacterium helveticum* ed allo *Streptobacterium casei*; nell'altro campione (ac. 28,6° S.H.), ha contato 13.090.000 germi per cc. rappresentati sostanzialmente (13.000.000) da bastoncini lattici coagulanti e da batteri gassogeno-coagulanti. L'A. si limita alle suddette constatazioni senza mettere in rilievo i caratteri dei ceppi isolati.

Da quanto è stato esposto, risulta che il siero-fermento rappresenta uno dei principali fattori per la riuscita fabbricazione del grana e che la sua importanza consiste nell'apporto dell'acidità e dei microrganismi che servono a combattere i principali difetti, tra i quali - in primissimo luogo - il gonfiore e che concorrono alla maturazione del formaggio. Ora i suddetti microbi non sono stati studiati sinora che assai superficialmente (lo scrivente non ha trovato altri lavori oltre a quelli sopracitati) oppure indicati solamente con nomi di determinate specie, nomi insufficienti a precisare le loro caratteristiche, tenendo conto particolarmente di notevoli varietà di ceppi appartenenti alle specie del genere *Thermobacterium* Orla Jensen.

Lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere i caratteri dei microbi predominanti nel siero-fermento, onde poter vedere - in seguito - l'influenza delle singole specie sulla preparazione del siero-fermento, sulla fabbricazione e sulla maturazione del formaggio grana.

Siccome, dall'esame di numerosi campioni di sierofermento, si è potuto constatare nella totalità dei casi l'assoluta predominanza dei bastoncini lattici appartenenti al genere *Thermobacterium*, la prima parte del lavoro è stata dedicata ai ceppi appartenenti al genere sopraindicato.

(1) G. Dalla Torre: *Sul contenuto microbico del grana durante la maturazione*. Annali dell'Istituto Caseario Zootecnico pel Mezzogiorno in Caserta, Vol. II, 1939, pag. 109.

(2) G. Dalla Torre: *Fermentazioni anormali del grana*. - Annali dell'Istituto Sperimentale di Caseificio di Lodi, 1925, fasc. 3-4.

Medicazione
Disinfezione
Deodorazione

A M U C H I N A

(Reg. Min. Int. 100/42)

Medicamento disinfettante istofilo ad uso umano

AMUCHINA "Z,"

(Reg. Min. Int. 100/43)

Medicamento disinfettante istofilo ad uso veterinario

ANTISAPRIL

(Reg. Min. Int. 99/41)

Disinfettante deodorante grezzo

LISICERINA

(Reg. Min. Int. 424)

Disinfettante antiaftoso

"C. L.",

Per disinfezione e detersione delle bottiglie del latte

AMUCHINA Soc. p. Az.

Sede: GENOVA - Via B Bosco, 37 - Telefono 55.357 - 53-723

Stabilimenti: SAMPIERDARENA - Via Pacinotti, 86 - Tel. 2-051

MILANO - Viale Umbria, 18 - Telefono 54-457

La razionale fabbricazione del formaggio esige che il caglio sia accuratamente controllato e con titolo costante.

A queste esigenze risponde

C. MOTTA & C. - MONZA

VIA CAIROLI 2a - TELEFONO 4613 - Casa Fond. nel 1926

Fabbrica monzese di caglio e coloranti per burro e formaggi.



FABBRICA PRODOTTI CHIMICI

Dott. V. SACCO

MILANO

VIA FILIPPO BALDINUCCI, 51 - TEL. 97-254

Il "Neomoscan,, ideato presso l'Istituto Sperimentale di Lattieria in Kiel, è l'UNICO prodotto che ha un potere DETERGENTE 3 volte superiore alla soda, unisce una attività BATTERICIDA 5 volte maggiore dell'acido fenico, offre una perfetta COMPATIBILITA' col latte e coi latticini, nonché una ASSOLUTA INNOCUITA' su metalli, legno e gomma.

Il "Neomoscan,, brevettato in 19 paesi del mondo, ha dimostrato nella pratica industriale:

- 1 di realizzare la pulizia e la disinfezione dei recipienti e delle macchine con un'ECONOMIA del 50% sui vecchi sistemi, riducendo fortemente le spese di combustibile, mano d'opera, spazzole, ecc.
- 2 di contribuire in modo efficacissimo alla IGIENICITA' del latte, al MIGLIORAMENTO dei prodotti caseari e alla buona MANUTENZIONE degli impianti.

2. - Le caratteristiche dei fermenti lattici del genere “*Thermobacterium*” Orla Jensen (1)

a) *Forme di termobatteri.*

I bastoncini appartenenti al genere *Thermobacterium* si presentano sotto varie forme, talvolta regolari, talvolta più o meno irregolari, forme che, in gran parte, dipendono dalla composizione dei terreni nutritivi e dallo stato di anaerobiosi.

Salvo qualche eccezione, si può affermare che non esistono sostanziali differenze tra i ceppi ed anche tra le specie stesse.

Nei terreni liquidi i termobatteri si presentano per lo più sotto forma di bastoncini di spessore vario, talvolta tozzi, talvolta sottili, dritti o ricurvi, isolati o riuniti due a due, spesso in lunghissimi filamenti. Mentre nei terreni agarizzati, oltre a forme regolari, si possono osservare spesso quelle ipertrofiche: bastoncini attorcigliati irregolarmente od a forma di anello, oppure rigonfi a forma di erre.

Orla Jensen scrive, nella sua fondamentale pubblicazione, che i termobatteri si presentano sotto forma di lunghi bastoncini con la tendenza a formare filamenti e non di rado strane arricciature; questi filamenti risultano composti da parecchi segmenti che si possono mettere in evidenza solo con i preparati allestiti con il balsamo di Canada e non coll'acqua.

Nelle culture giovani e vigorose si riscontrano per lo più bastoncini isolati o riuniti due a due. Nelle culture ottenute per striscio, se in largo contatto coll'ossigeno dell'aria, danno luogo a forme irregolari.

Generalmente presentano granuli di volutina che si possono mettere in evidenza con le colorazioni a base di bleu di metilene.

In alcuni ceppi, i granuli si riscontrano solo nei bastoncini giovani, mentre in altri nelle cellule di 2-3 giorni.

I termobatteri hanno per lo più uno spessore superiore di un micron; nelle culture vecchie si riscontrano forme rigonfiate o comunque involutive.

Henneberg (2) trova che i termobatteri presentano varie forme secondo i mezzi di coltura adoperati. Il *Tbm. lactis* si presenta nel latte spesso anche sotto forma di filamenti straordinariamente lunghi (23-300 x 0,7 μ), mentre, nelle culture in agar, si trovano lunghi bastoncini di forma normale, raramente ricurvi ed attorcigliati a forma di anello.

Nei terreni liquidi i bastoncini sono generalmente dritti, isolati o uniti due a due o tre a tre (6 x 0,7 μ o 2,8 x 0,7 μ).

Descrivendo in seguito i termobatteri dello jogurt, *Tbm. jugurt* e *Tbm. bulgaricum*, nonché il *Tbm. helveticum*, trova che le forme di questi sono pressochè uguali a quelle del *Tbm. lactis*.

(1) Il lavoro fondamentale di S. Orla Jensen riguardante la classificazione dei fermenti lattici « *The lactic acid bacteria* », è uscito in seconda edizione a Copenaghen a cura di « Mémoires de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark » nel 1942. Nel 1943 è stato pubblicato un complemento.

(2) Henneberg W.: *Handbuch der Gärungs bakteriologie* - II B., 1926.

Secondo Meubrink (1), il *Tbm. lactis* si presenta, nei terreni liquidi, sotto forma di bastoncini sottili o robusti, lunghi o corti, in genere di forma regolare, raramente un po' ricurvi ed assai spesso, particolarmente nel siero e nel latte, in lunghe catene. Sull'agar le forme sono irregolari, spesso unite in catene o in filamenti attorcigliati.

Il *Tbm. helveticum* e *Tbm. Bulgaricum* si differenzerebbero dal precedente per la tendenza a formare bastoncini assai lunghi e sottili, nonchè attorcigliati; nei terreni contenenti il peptone formano lunghe catene.

Demeter e Schmid (2) trovano che i termobatteri presentano al microscopio diverse forme; in parte sono corti bastoncini uniti due a due, in parte lunghi robusti bastoncini isolati o riuniti in lunghi filamenti e catene. Quest'ultima forma è particolarmente frequente nelle culture a tratti di penna.

Alcuni ceppi presentano, nelle culture a tratti di penna nell'agar sieropeptone, lunghe cellule in parte arrotolate, in parte rigonfie a forma di bollicine. Questi ceppi dimostrano sempre la capacità di fermentare il saccarosio e producono molto muco nel latte tornasolato.

Karnicki e Dörner (3) danno, in uno dei loro lavori, la seguente descrizione delle forme batteriche. Sette ceppi di termobatteri, classificati come *Tbm. helveticum*, prelevati dalle colonie ottenute con striscio in anaerobiosi (chiusura Burri) su agar siero-peptone, si presentavano come bastoncini isolati, raramente due a due e spesso diramati (verzweigt) delle dimensioni di $1.7 - 12 \times 0,8 - 1 \mu$, un ceppo sotto forma di bastoncini isolati regolarmente con gli estremi arrotondati relativamente corti e grossi (spessore $0,9 \times 1,3 \mu$) od un altro ceppo come bastoncino isolato, raramente a due a due abbastanza regolare ($3,5-7 \times 0,6-0,9 \mu$).

Gli undici ceppi, descritti come appartenenti al *Tbm. lactis*, presentavano forme alquanto diverse; alcuni si presentavano sotto forma di sottili bastoncini ($d = 0,7$) isolati od in filamenti irregolari, altri come bastoncini di forma regolare isolati due a due o in brevi catene, oppure come sottili bastoncini ($0,5-0,6 \mu$) isolati e regolari, altri ancora molto sottili ($0,4 \mu$) bastoncini ($0,5-0,6 \mu$) isolati e regolari, altri ancora molto sottili ($0,4 \mu$) riuniti in catene ricurve, altri ancora in catene irregolari e con notevole spessore ($2,5 \mu$).

Le catene ed i filamenti si trovano quasi sempre gli uni accanto agli altri. Il quadro microscopico viene fortemente influenzato dalla presenza dell'ossigeno, in quanto la formazione di catene, si ha talvolta solo in anaerobiosi mentre, in presenza dell'ossigeno, queste non si sviluppano. Altrettanto variano, secondo la presenza dell'ossigeno, lo spessore e la conformazione regolare.

(1) Meubrink: «Milchw. Forsch.», 1928, Vol. 6, pag. 187.

(2) Demetr K. I. e A. Schmid: *Über das Verhalten der einzelnen Milchsäurebakteriengruppen bei Emmentaler Käsen*. - Milchw. Forsch., 1936, Vol. 17, pag. 270.

(3) Karnicki F. e W. Dörner: *Die Milchsäurebakterienflora der in der schweizerischen Käseerei üblichsten Lab und Kulturarten*. - «Landw. Jahrbuch der Schweiz», 1934.

Burri e Kollmann (1) trovano che il *Tbm. helveticum* e *Tbm. lactis* hanno forme nettamente distinte, in modo che l'esame microscopico dei singoli ceppi, tenendo presente anche la forma delle colonie, può portare un sostanziale contributo alla classificazione.

Comune a tutti i bastoncini appartenenti al *Tbm. helveticum* è una certa lucentezza e pronunciata rifrangenza, mentre la lunghezza è assai varia; alcuni ceppi sono rappresentati solo da corti e tozzi bastoncini, altri solo da lunghi od altri ancora di forme lunghe e torte. Lo spessore è per lo più regolare e quasi sempre supera un micron. Generalmente i bastoncini sono lineari e diritti con estremi poco arrotondati. Il *Tbm. Lactis* invece si presenta sotto forma di bastoncini contorti, piuttosto snelli, cioè relativamente sottili rispetto la lunghezza ed assai poco rifrangenti la luce. Dette forme si riscontrano nelle grosse ed opache colonie prive di struttura. Negli altri tipi di colonie, le forme possono subire delle oscillazioni; si possono avere bastoncini ricurvi, ma grossi; oppure molto lunghi o sotto forma di filamenti per nulla ritorti.

Tutti i termobatteri isolati da Kantardjieff (2) dallo jogurt, dal caglio naturale, dalle culture usate nella fabbricazione dell'emmental presentano nelle colonie, particolarmente se sviluppati alle temp. ottime, forme pressochè uguali; cioè bastoncini spesso ritorti a forma di anello. Un ceppo capace di fermentare saccarosio si presentava ad una estremità ramificato. Nelle culture in latte e brodo zuccherato, tutti i ceppi presentano bastoncini regolari con più o meno spiccata tendenza per la formazione delle catene che arrivano sino a 200 μ .

b) *Forma delle colonie.*

Secondo Burri e Kollmann (3) il *Tbm. Lactis* presenta sei tipi di colonie, probabilmente dovute alla spiccata tendenza di questo germe alla dissociazione.

- c) Colonie di medie dimensioni membranose, sottili a forma di disco rotondanti.
- b) Colonie relativamente piccole, od anche grosse a cosiddetta forma di anello, cioè colonie aventi un disco centrale di struttura poco appariscente e con margine a pieghe ispessito e senza struttura.
- e) Colonie di medie dimensioni membranose, sottili a forma di disco rotonde, in trasparenza di colore grigio-verdognolo, di struttura finemente cristallina, ossia sabbiosa.
- d) Uguali alle precedenti, però senza il margine rotondo, ma lobate, con o senza le pieghe del margine.

(1) Burri R. e Kollmann. H.: *Studien über die Gattung Thermobacterium (Orla Jensen) mit besonderer Berücksichtigung der Säurungsflora des jungen Emmentaler Käses* - «Landw. Jahrbuch der Schweiz», 1941.

(2) Kantardjieff A. - *Untersuchungen über echte Milchsäurelangstabchen* - «Milchw. Forsch. », 1929, Vol. 7, pag. 171.

(3) Burri e Kolmann: loco cit.

- e) Colonie relativamente grandi, opache che viste in trasparenza non dimostrano alcuna struttura.
- f) Colonie relativamente grosse, con margine approssimativamente rotondo, di struttura grossolanamente cristallina che appare talvolta poco, talvolta assai distinta. In questo ultimo caso assomigliano alle colonie descritte per il *Tbm. helveticum*.

Di questi tipi è caratteristico solamente quello indicato sotto c).

Le colonie di *Tbm. helveticum* invece appartengono al cosiddetto tipo cristallino, tipo che si manifesta qualora la colonia risulta composta da bastoncini riuniti in fasci paralleli; questa disposizione determina la figura esteriore della colonia in modo da comparire come un conglomerato cristallino sviluppato in piano, prestando numerosi piani e spigoli, ed inoltre - nella osservazione in trasparenza - si nota una vivace iridescenza.

Questo tipo si può riscontrare nelle colonie superficiali degli aerobi sporigeni ed assomiglia più o meno al cosiddetto tipo « ruvido » (rough) che si osserva nella dissociazione del gruppo Coli-aerogenes.

L'aspetto normale delle colonie di *Tbm. helveticum* è caratterizzato dal tipo grossolanamente cristallino.

Orla Jensen e collab. (1) affermano che i termobatteri che producono acido lattico inattivo, cioè *Tbm. helveticum*, *Tbm. jugurt* e *Tbm. intestinale*, danno quasi sempre luogo a colonie tipo « caput medusae » (cioè con margini dai quali partono appendici somiglianti a trecce di capelli), queste colonie per lo più non si verificano per i termobatteri che producono acido lattico levogiro (*Tbm. lactis* e *Tbm. bulgaricum*).

Il Puntoni (2) asserisce d'altra parte di aver riscontrato che i ceppi di termobatteri isolati dal *Kos* (latte acido prodotto in Albania, uguale allo jogurt), con colonie granulose e tipo « caput medusae », producevano acido lattico inattivo e lievemente destrogiro, indipendentemente dal tipo delle colonie.

Kantardjjeff (3) trova per i termobatteri in aerobiosi sulla superficie dell'agar siero-peptone, tre tipi di colonie e precisamente:

- 1) irregolarmente rotondeggianti o debolmente ed irregolarmente lobate, molto sottili e trasparenti, non lucide, con il $d = 1,5 - 2$ mm. Struttura interna fioccoso-cristallina. Margine sinuoso verso l'interno, regolarmente trasparente, nel centro macchiato o granuloso; a $94\times$ il margine ha la forma di una massa di capelli, interno della colonia si presenta come una massa scompigliata.
- 2) a forma di disco, sopraelevate sino ad assumere la forma di goccia di lucentezza umida, semi-trasparente (giovani quasi trasparenti) con il

(1) Orla Jensen S.A., D. Orla Jensen, O. Winter: *Bacterium bifidum und Tbm. intestinale* - « Zentralbl. f. Bakter », Abt. II, 1935-36.

(2) Puntoni: *Dissociazione del bacillo bulgaro* - Annali di microbiologia, Vol. II, fasc. IV, 1942.

(3) Kantardjjeff A.: loco cit.

d= 0,80 - 0,9 mm. struttura tipicamente cristallina; a 34_x non si osserva più struttura cristallina, ma uniformemente granulosa e verso il centro la colonia risulta più scura. A 94_x il margine ha forma di una massa di capelli, struttura interna nelle vicinanze del margine scompigliata, verso l'interno granulosa.

- 3) come il 2, soltanto il diametro arriva a 1,5 mm. sopraelevate e bianchicce, non spiccatamente cristalline, a 32_x il centro scuro e non trasparente, solo la zona del margine risulta trasparente, a 94_x il margine non si presenta spiccatamente come una massa di capelli, ma più decisamente contornato.

Karnicki e Dorner (1) invece, danno per i termobatteri i seguenti tipi di colonie, che possono svilupparsi sulla superficie dell'agar tanto in aerobiosi quanto in anaerobiosi:

- a1) colonie piatte trasparenti del diametro di 1 mm., con prolungamenti a forma di masse di capelli;
- a2) piatte, trasparenti senza o con piccoli prolungamenti, con il diametro di 1 mm., di struttura più o meno concentrica e margini più trasparenti. In genere assomigliano al tipo a1, ma sono più regolari.
- a3) irregolarmente rotonde, piatte, di lucentezza umida, con il centro sopraelevato e margini più trasparenti;
- b) colonie rotonde sopraelevate, di lucentezza umida e di struttura cristallina o debolmente cristallina;
- c) colonie grosse sopraelevate, di lucentezza umida e senza struttura cristallina.

I nominati A.A. non trovano che le suddette colonie siano caratteristiche per le singole specie dei termobatteri, inquantochè, dai sette ceppi classificati come *Tbm. helveticum*, quattro presentano colonie del tipo b) sull'agar siero-peptone in anaerobiosi, due del tipo a1) e uno del tipo c).

c) *La capacità di acidificare i glucidi ed alcoli polivalenti.*

Una delle principali caratteristiche su cui si basa la classificazione delle specie appartenenti al genere *Thermobacterium* riguarda la capacità di acidificare i glucidi ed alcoli polivalenti.

Alcuni A.A. con Orla Jensen in testa, le danno un'importanza decisiva, mentre altri, pur dandole un notevole valore diagnostico, non la ritengono sufficiente per la determinazione della specie e spesso ne tengono poco conto, se l'assieme degli altri caratteri collima in modo da definire sufficientemente il microrganismo in esame.

Per la determinazione della detta proprietà, si dà molta importanza al procedimento tecnico ed in particolar modo alle sostanze azotate adoperate nei terreni nutritivi base. Orla Jensen dà molto peso anche alla quantità di acidità prodotta.

(1) Karnicki F. e Dorner W.: *loco cit.*

Orla Jensen e collaboratori (1) hanno ripetutamente dimostrato che la capacità di fermentare i glucidi non può essere messa in rilievo con la sola aggiunta di tornasole, in quanto la colorazione rossa di questo, può dipendere dalle impurità di sostanze azotate o glucidi che vengono aggiunti.

Affermano inoltre che bisogna tener conto anche della qualità delle sostanze azotate aggiunte, perchè il potere fermentativo di alcuni batteri dipende in parte dalla forma sotto la quale è aggiunto l'azoto. Per es.: il peptone Witte contiene azoto sotto forma poco adatta per lo sviluppo dei fermenti lattici, mentre si presenta assai adatto il peptone ottenuto dalla digestione della caseina. Queste sostanze, per se stesse e forse anche meglio per gli attivatori che contengono, permettono l'attacco di alcuni zuccheri difficilmente fermentescibili.

Ciò è stato confermato anche da Eagles e Sadler (2).

Orla Jensen e collab. riportano una tabella, nella quale mettono in evidenza la costante capacità delle singole specie appartenenti al genere *Thermobacterium* di fermentare alcuni glucidi con la produzione di notevoli quantità di acido lattico, durante un periodo di 17-20 anni. (Per il *Tbm. helveticum* vedi tabella n. 1).

Commentando la tabella, gli A.A. scrivono quanto segue: « La tabella « dimostra che il *Tbm. helveticum* ed il *Tbm. jugurt* non sono stati capaci, « nel corso degli anni, di fermentare saccarosio, raffiniosio, inulina e salicina. Anche la loro capacità di fermentare il levulosio, si è dimostrata assai « debole, particolarmente per il *Tbm. jugurt*. Nei riguardi del potere fermentativo, i due batteri si distinguono solamente perchè il *Tbm. Jugurt* « non fermenta in nessuna circostanza maltosio, destrina ed amido, mentre « ciò è possibile, con aggiunta di particolari composti azotati (peptone ottenuto dalla caseina ed estratto di lievito), al *Tbm. helveticum*, *Tbm. jugurt* e *Tbm. bulgaricum*; hanno un habitat così specifico nel latte che, dei « disaccaridi, fermentano solamente il lattosio. Dalla tabella risulta inoltre « che il *Tbm. bulgaricum* stenta a fermentare il galattosio, pur essendo « questo un prodotto della scissione del lattosio. Come è stato detto, il *Tbm. bulgaricum* produce acido lattico levogiro e normalmente non si riscontra « nelle feci ».

Dalla tabella risulta anche che tutti i ceppi di *Tbm. lactis* fermentano costantemente levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio e salicina.

A. Kantardjief (3) ha studiato sette ceppi di termobatteri isolati dallo jogurt, due ceppi delle culture per formaggio di Liebefeld e Rütli e quattro ceppi dal « caglio naturale ».

Il terreno base conteneva acqua di lievito, preparata con circa 7,5% di lievito compresso (dalla quale è stato allontanato lo zucchero facendovi sviluppare il *Bac. coli*), 0,1 % di peptone (non meglio specificato), 1,5 % dello zucchero in esame e 1 cc. di soluzione di tornasole.

(1) S. Orla Jensen e collab.: *loco cit.*

(2) Eagle A. e Sadler W.: « *Canad. Journ. Research.* », Vol. 7, 1932, pag. 364.

(3) Kantardjief A.: *loco cit.*

Dall'esame di sette ceppi di termobatteri isolati dallo jogurt originale, l'A. ha trovato che cinque fermentano colla stessa intensità (+) il maltosio di altri due isolati dalle culture casearie di Liebefeld e Rütli e di un ceppo isolato dal caglio naturale. Secondo questo risultato la caratteristica sostanziale, cioè la capacità di fermentare il maltosio, che differenzia il *Tbm. helveticum* dal *Tbm. bulgaricum* (secondo Orla Jensen) cadrebbe, a meno che si vogliano considerare i ceppi isolati dallo jogurt come *Tbm. helveticum*. D'altra parte questa constatazione ha un valore relativo, non avendo Kantardjjeff misurato la quantità di acidi prodotti a spese dei singoli glucidi ed alcoli.

L'A. ha inoltre constatato come un ceppo isolato dallo jogurt che non fermentava il maltosio, ha dato, dopo alcuni trapianti, luogo a due tipi diversi di colonie comprendenti ambedue bastoncini capaci di fermentare il maltosio e, oltre a questo, xilosio e mannosio che prima non venivano fermentati.

Burri e Kollmann riportano dati molto importanti riguardanti la capacità di acidificare i glucidi ed alcoli. Il terreno nutritivo per la ricerca del potere fermentativo era composto nel seguente modo: peptone Witte gr. 10 - peptone Merk per batteriologia gr. 10 - estratto di carne Oxo Bouillon gr. 5 - lievito autolisato gr. 5 - p.H. = 6.0. Come indicatori furono usati bromocresolverde e bromocresolporpora in soluzione 1% aggiunti in ragione di 17.5 cc. per ogni litro di terreno.

Bisogna premettere che gli A.A. davano la massima importanza per la determinazione delle singole specie ai seguenti caratteri forma superficiale delle colonie sull'agar a becco di clarino con chiusura anaerobica, massima temperatura di sviluppo, massima produzione di acidità.

Gli A.A. hanno studiato 128 ceppi di *Tbm. helveticum* classificati in base alle suddette caratteristiche, isolati dal formaggio emmental fresco, dal caglio e dalle culture adoperate per la fabbricazione del formaggio. Dagli stessi substrati furono isolati 119 ceppi appartenenti al *Tbm. lactis*.

Burri e Kollmann hanno constatato che i 120 ceppi appartenenti al *Tbm. helveticum* acidificano costantemente destrosio, mannosio, galattosio e lattosio, in maggioranza, anche levulosio, maltosio, destrina.

Ripetendo le prove del potere fermentativo ad intervalli di parecchi mesi, alcuni ceppi perdevano od acquistavano la capacità di fermentare levulosio, maltosio e destrina. Tra questi ultimi il maltosio era quasi sempre fermentato. Perciò gli A.A. dividono la capacità fermentativa del *Tbm. helveticum* in una parte costante e precisamente: glucosio, galattosio, mannosio e lattosio, ed una incostante: levulosio, maltosio, destrina.

La capacità di fermentare il maltosio non sarebbe dunque un carattere fisso del *Tbm. helveticum* come afferma Orla Jensen. E' stato riscontrato un ceppo il quale non fermentava mai il maltosio.

Un gruppo di ceppi ha fermentato anche il raffinosisio.

Per i 119 ceppi di *Tbm. lactis* gli A.A. hanno riscontrato che solo 29 fermentavano tutti gli zuccheri indicati da Orla Jensen: levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, destrina e salicina, men-

tre gli altri non fermentavano alcuni dei seguenti zuccheri: levulosio (18 ceppi), saccarosio (11 ceppi), maltosio (25 ceppi); destrina (14 ceppi), salicina (64 ceppi).

Ripetendo l'esame della capacità fermentativa dopo 6-12-18 mesi, alcuni ceppi acquistavano o perdevano la capacità di acidificare levulosio, saccarosio, maltosio, destrina e salicina in modo che, anche il potere fermentativo del *Tbm. lactis*, sarebbe rappresentato da una parte costante: destrosio, mannosio, galattosio e lattosio, ed una non costante: levulosio, saccarosio, maltosio, destrina, salicina. Così anche per il *Tbm. lactis* l'affermazione di Orla Jensen circa la costante capacità di questo ceppo di fermentare il maltosio e saccarosio, sarebbe in contrasto con i suddetti risultati ottenuti da Burri e Kollmann; questa affermazione, naturalmente non può essere categorica, dato che Orla Jensen dà valore alla capacità fermentativa solo quando l'acidità prodotta viene messa in evidenza anche quantitativamente.

Risulta dunque che tanto i ceppi appartenenti al *Tbm. helveticum*, quanto al *Tbm. lactis* fermentano costantemente i medesimi zuccheri e precisamente: destrosio, mannosio, galattosio e lattosio.

Gli A.A. hanno inoltre trovato numerosi ceppi da considerarsi appartenenti al *Tbm. lactis* con seguenti « simboli » di fermentazione:

- 1) sorbite, mannite, levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, destrina, salicina (5 ceppi);
- 2) sorbite, mannite, levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, raffinofosio, destrina, salicina (15 ceppi);
- 3) levulosio, destrina, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffinofosio, destrina, salicina (1 ceppo).

Secondo Burri e Kollmann i ceppi del *Tbm. lactis* da loro studiati si dividono, in base alla capacità di fermentare i glucidi, in totale in quattro gruppi, comprendenti ciascuno rispettivamente 29 - 59 - 15 - 1 ceppi.

Tra gli altri lavori riguardanti la capacità di fermentare alcuni glucidi, sono importanti le ricerche di Winegge e Henneberg (1) i quali affermano che il *Tbm. lactis* conserva la proprietà di fermentare il maltosio anche se per degli anni viene coltivato nel latte (privo di maltosio).

Nei riguardi del *Tbm. bulgaricum* invece hanno constatato quanto segue: degli 11 ceppi appena isolati dallo yogurt originale, 8 non erano capaci di fermentare il maltosio, due debolmente ed uno fortemente; dopo 4 trapianti in latte aggiunto di maltosio, 9 ceppi acquistavano la capacità di fermentare fortemente il maltosio ed uno debolmente (in totale tutti i ceppi fermentavano il maltosio). Dopo tre settimane di trapianti in latte senza maltosio, 9 ceppi non fermentavano più il maltosio, tre invece ancora un po' (pag. 111). In un'altra pagina gli A.A. affermano che « Uebrigens sind *Th. bulgaricum* und *Th. lactis* keineswegs als Arten im botanischen Sinne aufzufassen; ersteres kann wohl nur als eine durch bestaenclige Zuechtung in Milch bei 45°-50° « abgeschwaechte » (s. Zuckerreihe) Rasse des *Th.*

(1) Winegge e Henneberg W.: *Zur Kenntnis der stäbchenförmigen Milchsäurebakterienarten* - « Zentralbl. f. Bakter. », II Abt., Vol. 91, 1934-1935, pag. 102.

TABELLA N. 1

Specie	Ceppo N.	Autore	Glicerina	Xilosio	Arabinosio	Ramnosio	Sorbito	Mannite	Levulosio	Destrosio	Mannosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Raffinosio	Insulina	Destrina	Amido	Salicina
Tbm. lactis	6	Orla Jensen	0	0.5	0.5	0.2	0	6.8	11.3	9.7	13.7	1.1	11.9	12.4	7.9	11.5	5.4	6.1	5.6	10.1
"	7	"	0	0	0.5	0.2	0	—	14.9	14.6	14.2	5.6	13.3	13.5	9	0.7	0	7.9	6.1	5.5
"	8	"	0.2	1.1	1.1	0.5	0.2	0	16.2	15.1	14.9	7.9	14.9	11.9	9	3.2	0.7	5.2	4.3	11.5
"	9	"	0	0	1.1	0.2	0.2	0	16.0	14.9	14.9	13.5	17.1	14.2	15.5	5.2	0.2	6.8	6.5	5.0
"	10	"	0	0	0.7	0.2	0	0	15.1	15.3	14.6	12.4	16.7	13.1	11.3	7.2	5.6	5.4	8.3	1.6
"	11	"	0	0	0.7	0	0	0.7	11.9	13.7	5.2	7.9	14.4	14.4	10.4	0.9	0.2	1.1	0.2	3.4
"	11 ceppi	Karnicki e	0	0	0	0	0	0	0.2	0.9	1.1	0	0.4	0	1.6	0	0	0.2	0	—
"		Dorner (1)	0.5	0.7	0.7	0.4	0.4	0.7	3.8	5.2	6.7	2.5	3.4	7.6	4.7	3.1	0.4	0.9	0.7	2.2

(1) Le cifre riguardano 11 ceppi e sono rispettivamente i minimi e i massimi dell'acidità prodotta tra tutti gli undici.

lactis d.h. als eine « Zuckerreihe-Variation » gelten ». Nei riguardi delle serie dei glucidi ed alcoli, si differenzia poco anche il *Tbm. helveticum* dal *Tbm. lactis*, perchè differenze della fattispecie si riscontrano tra gli stessi ceppi del *Tbm. lactis*. Noi dobbiamo considerare il *Tbm. helveticum* una razza che si sviluppa nello stomaco dei vitelli lattanti, che ha perso la capacità di produrre granuli di volutina.

Il *Tbm. bulgaricum*, nei riguardi della serie dei glucidi ed alcoli, non si distingue dal *Tbm. jugurt*, il quale è da considerarsi una varietà del primo, incapace di produrre granuli di volutina.

F. Karnicki e W. Dorner hanno adoperato il seguente terreno nutritivo per la ricerca dell'acidificazione dei glucidi e degli alcoli:

Brodo di carne di cavallo + 1 % di peptone Witte + 1 % di peptone Merk (dalla caseina) + 0,1 % di estratto di lievito Difco.

Il pH. 6,8; la sostanza in esame veniva aggiunta al terreno in ragione dell'uno per cento prima della sterilizzazione.

I risultati riguardanti il *Tbm. lactis* sono riportati nella tabella n. I.

Gli A.A. hanno classificato come *Tbm. helveticum* sette ceppi, dei quali solo uno dimostra una notevole capacità di fermentare il maltosio, dando una acidità di 3,4 ‰ espressa in acido lattico, mentre gli altri producono solamente 0,4 - 0,7 - 1,1 - 1,3 ‰ di acido lattico.

Tenendo presente che l'Orla Jensen, parlando del *Tbm. intestinale*, afferma che questo bastoncino non produce dai pentosi ed alcoli una fermentazione degna di nota (nennenswerte Vergärung), pur arrivando l'acidità prodotta al 2 ‰ e considera il maltosio non fermentato da parte del *Tbm. bulgaricum e jugurt*, pur essendo l'acidità da questi prodotta di 0,9 ‰ (1), i suddetti ceppi dovrebbero considerarsi incapaci di fermentare il maltosio. Non bisogna d'altra parte dimenticare che l'acidità prodotta a spese dei glucidi ben fermentati e misurata da Karnicki e Dorner, risulta notevolmente più bassa eli quella riscontrata da Orla Jensen.

Gli A.A. inoltre dichiarano che alcun ceppi hanno perduto od acquistato, dopo un periodo di tre mesi, la capacità di acidificare il levulosio.

K. I. Demeter e A. Schmid (2) hanno trovato nel formaggio emmental solamente due gruppi di termobatteri: uno appartenente al *Tbm. helveticum* e l'altro al *Tbm. lactis*. La classificazione ne è stata fatta basandosi sostanzialmente sulla capacità di fermentare il saccarosio ed il maltosio: cioè tutti i ceppi appartenenti al *Tbm. lactis* fermentavano il saccarosio ed il maltosio (oltre ad alcun altri zuccheri), mentre quelli appartenenti al *Tbm. helveticum* fermentavano il maltosio, ma non il saccarosio. Il terreno base addizionato dell'1 % di zucchero è stato quello stesso adoperato da Kantardjjeff, solamente, invece del tornasole, è stato adoperato come indicatore il bleu di bromotimolo. Non è stato riscontrato alcun ceppo che non fermentasse i suddetti zuccheri in modo da presentare dei dubbi nei riguardi della classificazione.

(1) *Loco cit.*, pag. 77 (tabella).

(2) Demeter K. I. e Schmid A.: Über das Verhalten der einzelnen Milchsäurebakteriengruppen bei Emmentaler Käsen.- « Milchw. Forsch. », 1936, Vol. 17, pag. 270.

Secondo Bergey (1) il *Lactobacillus helveticus* (rispondente al *Tbm. helveticum* Orla Jensen) acidifica i seguenti zuccheri: levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio e destrina, mentre dal *Lactobacillus lactis* (rispondente al *Tbm. lactis* Orla Jensen), sono fermentati: levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffiniosio e destrina.

d) *Qualità dell'acido lattico prodotto.*

Secondo Orla Jensen (2), la qualità ottica dell'acido lattico prodotto dai fermenti lattici è un fattore decisivo per la loro classificazione: il *Tbm. lactis* ed il *Tbm. bulgaricum* producono acido lattico levogiro, mentre il *Tbm. helveticum* e *Tbm. jugurt* inattivo, e il *Tbm. intestinale* acido lattico inattivo puro o con un'aggiunta di levogiro.

Questo valore però è alquanto contrastato da taluni A.A.

Secondo Henneberg (3) il *Tbm. lactis* coltivato in estratto di lievito produce dal destrosio, saccarosio, destrina e maltosio, acido lattico levogiro, mentre dal lattosio destrogiro. Kantardjjeff e Popov (4) hanno constatato che un ceppo di *Tbm. bulgaricum* coltivato in latte e mosto di birra, produceva acido lattico levogiro, mentre nel brodo destrosato inattivo, altro ceppo appartenente alla stessa specie, produceva acido lattico levogiro nel latte e nel brodo destrosato, e inattivo nel mosto di birra.

Interessanti sono a questo proposito i risultati ottenuti da H. Katagiri e W. Kitahara (5) i quali hanno dimostrato che alcune specie microbiche hanno la proprietà di racemizzare acido lattico otticamente attivo.

Tale proprietà è dovuta alla racemasi che essi hanno trovato in diversi fermenti lattici, nonchè in *Staph. ureae*. Il *Lactobacillus sake* sembra influenzato dal mezzo culturale nella elaborazione della racemasi; infatti può dare acido lattico destrogiro, se coltivato in estratto di riso, e racemico, se coltivato in estratto di lievito.

e) *Temperature di sviluppo e coagulazione del latte.*

I termobatteri richiedono, come dice il loro nome, temperature relativamente alte per il loro sviluppo.

Secondo Orla Jensen (6) la temperatura ottima è a circa 40° C., la massima di regola è a 50° C., ma il *Tbm. bulgaricum* cresce ancora a 52,5° C. Non crescono sotto i 20-22° C. ed anche a 30° C. lo sviluppo è molto lento; ne fa eccezione un ceppo che cresce ancora a 18° C. Generalmente non vengono uccisi alle temperature inferiori a 75° C.

Burri e Kollmann (7), che danno grande importanza alle temperature

(1) Bergey D. H.: *Determinative Bacteriology* - 5 Ed., London, 1939.

(2) Orla Jensen: *loco cit.*

(3) Henneberg W.: *Handbuch der Gärungsbakteriologie* - II Abt., pag. 130, 1926.

(4) Kantardjjeff A. e Popov I.: *Über die optische Modification der vom sog. Bact. bulgaricum gebildete Milchsäure* - «Milchw. Forsch.», 1931, Vol. II.

(5) Katagiri H. e Kitahara W.: «Biochem. J.», 31, 1937, pag. 909; e «Jahr. chem. Soc. Japan», II, 1939; pag. 997.

(6) Orla Jensen: *loco cit.*

(7) Burri e Kollmann: *loco cit.*

TABELLA N. 2

KARNICKI E DORNER (1) Tbm. helv., bulg. e lactis		KANTARDIEFF (2) Tbm. bulg., lactis e helveticum		VIRTANEN E LUNDMARK (3) Bact. casei epsilon		
	% di N. solub. nel latte (*)		% di N. solub. nel latte (**)	Tempo trascorso in ore dopo l'ag- giunta di toluolo	N. sol. in % del N. totale (***)	Azoto ammidico in % N. totale
Controllo	Culture in latte magro con creta dopo 6 settimane a 30° C.	Controllo	Le culture in latte con creta sono state tenute per 5 giorni in termostato poi a 25° C.	0	44.24	2.42
0,089	0,13 — 0,20	0,0375	0,075 — 0,141	26	—	8
				456	96.71	23.25

(*) Le sostanze proteiche sono state precipitate coll'acetato di uranile, perciò il N ammoniacale passa nel filtrato (Vedi F. Kopatschek: *Nachweis des Ammoniaeks in der Milch.* - « Milch. Zentralbl. », 1931, pag. 309).

(**) Le sost. proteiche sono state precipitate coll'acido fosfowolframico e il N. solubile determinato nel filtrato.

(***) Culture in latte magro con creta sono state tenute a 37° C. per 24 ore, poi aggiunte di toluolo e tenute ancora sempre a 37° C. Dopo l'aggiunta di toluolo le culture risultarono morte. Le proteine sono state precipitate a 100° C. coll'acido acetico e il N. solub. determinato nel filtrato. N. ammidico è stato determinato con il metodo Van Slyke.

(2) *Loco cit.*

(1) *Loco cit.*

(3) Virtanen A. E. e Lundmark E.: *Über des Wesen der Käseinspaltung durch Milchsäurebakterien.* - « Milchw. Forschungen », 1929, Vol. 8, pag. 375.

TABELLA N. 3

BARTHEL (1) <i>Bact. casei epsilon</i>		ORLA JENSEN (2) <i>Bact. casei epsilon</i>		
Tempo di incubazione	In % di N. totale		Tempo di incubazione	In % di N. totale
2 mesi	N. solubile	N. degli amminoacidi (Van Slyke)	Un paio di mesi	N. solubile
	33,66	23,08		N. degli amminoacidi ammoniacale
				N. ammoniacale
				36,12
				34,60
				3,91
Culture in latte aggiunto di creta tenuto a 36° C. per due mesi. Latte aggiunto di creta				

(1) Barthel Chr.: *Das kaisenspaltende Vermögen von zu Gruppe Streptococcus lactis gehörenden Milchsäurebakterien.* - « Zentrabl. f. Bakter. », II Abt., Vol. 44, 1916, pag. 76.

(2) Orla Jensen: *Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft.* - Jena, 1913.

di sviluppo anche nei riguardi della classificazione, affermano che solo il *Tbm. lactis* è in grado di svilupparsi a 51° C., mentre la crescita degli al-tri termobatteri non si verifica più a tali temperature.

Karnicki e Dorner (1) trovano che gli ottimi di sviluppo oscillano tra 37° e 45° C. e mettono in rilievo che il rapido sviluppo nel latte non permette di precisare con esattezza la temperatura ottima di sviluppo, inquantochè il latte coagula nello stesso tempo tanto a 37° quanto a 42° e 45° C.

Sempre secondo i suddetti AA. il latte tenuto a temperature ottime di sviluppo ed innestato con 0,5 % di cultura impiega a coagulare, a secondo del ceppo in esame, da 12 a 48 ore.

In genere i più rapidi sono i ceppi appartenenti al *Tbm. lactis*. Le temperature ottime alle quali si arriva al massimo grado di acidità, sono generalmente inferiori a quelle di sviluppo e quasi sempre si trovano a 30° e 37° C. Tra le temperature ottime di sviluppo e queste non esiste alcun rapporto.

Secondo Henneberg (2) le culture appena isolate del *Tbm. lactis* hanno in principio un ottimo sviluppo a 40-48° C., più tardi a 36-40° C.; l'ottimo di acidificazione è, all'inizio, a 41-42° C., mentre più tardi scende a 36-37° C.

Per il *Tbm. helveticum* cioè *Lactobacillus helveticus* il Bergey (3) indica le seguenti temperature: minima 20-22°, ottima 40-42° C. e massima 50° C.

Come è già stato detto altrove, secondo Burri e Kollmann, una delle principali caratteristiche del *Tbm. helveticum* è il mancato sviluppo alle temperature superiori a 50° C., Pjeturson (4) ha trovato infine per un ceppo che temperature ottime si trovano già a 30-40° C.

f) *Il potere proteolitico.*

E' noto che i termobatteri si riscontrano nei formaggi a pasta cotta, particolarmente nei primi giorni di maturazione, in quantità tali da prendere un'assoluta predominanza su tutti gli altri microbi. Perciò la loro capacità di attaccare le sostanze proteiche, ed in particolar modo la caseina, assume un'importanza fondamentale per l'andamento della maturazione dei formaggi sopraindicati.

La teoria di V. Freudenreich, secondo la quale i bastoncini lattici sono da considerarsi principali maturatori dei formaggi svizzeri a pasta cotta, si basa sostanzialmente sulla capacità di questi di trasformare la caseina in composti azotati solubili.

Tale proprietà è stata dimostrata da numerosi autorevoli autori colle culture in latte magro aggiunto di carbonato di calcio. In detto terreno il pH. risulta pressochè uguale a quello della pasta dei formaggi cotti.

(1) Karnicki e Dorner: *loco cit.*

(2) Henneberg W.: *loco cit.*

(3) Bergey: *loco cit.*, pag. 17.

(4) Pjeturson: cit. Demeter in Löhns: « Handb. d. Landw. Bakteriologie », 1941.

Nella tabella n. 2 sono riportati i dati ottenuti da Orla Jensen (1), Karnicki e Dorner (2), Barthel (3), Virtanen e Lundmark (4). Dalla stessa risulta come le principali specie del genere *Thermobacterium* sono capaci di solubilizzare circa il 30-40% di azoto contenuto nel latte magro.

Unico Autore che asserisce di non aver riscontrato detto potere, nei bastoncini lattici è Weigner (5) ma, al suo lavoro, si possono muovere serie obiezioni dal punto di vista microbiologico nei riguardi della qualità dei ceppi adoperati ed anche della stessa purezza delle culture.

TABELLA N. 4

Specie microbica (*)	N. solubile totale in %	N. solubile meno N. degli albuminosi e peptoni superiori in % (**)
Tbm. lactis	39,8	35,6
Tbm. lactis	24,0	22,2
Tbm. helveticum	39,7	29,0
Tbm. bulgaricum	26,9	23,4

(*) le culture furono allestite in latte sterile aggiunto di 2% di carbonato di calcio. Dopo l'innesto furono tenute per 15 ore a temperatura ottima di sviluppo ed il resto del tempo a temperatura di ambiente.

(**) Precipitati con acido tannico.

3. - Tecnica della sperimentazione

a) CARATTERI GENERALI DEI CAMPIONI DI SIERO-FERMENTO, DAI QUALI FURONO ISOLATI I CEPPI STUDIATI.

Prima di passare in rassegna i metodi usati nella tecnica della sperimentazione, si ritiene utile riportare alcuni caratteri dei campioni di siero-fermento, dai quali furono isolati ceppi studiati. Questi campioni sono stati prelevati sempre presso i caseifici, nei quali il grana prodotto veniva classificato quasi nella totalità dei casi come « scelto ». Infatti tutte le forme fabbricate con il siero-fermento esaminato, controllate dopo un anno e mezzo o due anni circa di stagionatura, non presentano difetti di sorta.

(1) Orla Jensen: *loco cit.*

(2) Karnicki e Dorner: *loco cit.*

(3) Barthel, *loco cit.*

(4) Virtanen e Lundmarck *loco cit.*

(5) Weigner: *cit. Kantardjieff, loco cit.*

(6) Drewes K.: *Die Reifungspitze des Säuremilchkäses unter besonderer Berücksichtigung ihres Kaseinabbauvermögens* - « *Milchw. Forsch.* », Vol. 18, 1937, pag. 289.

Ceppo N.	Materiale di provenienza
1-11	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 9-1-1940. Al microscopio si osservano moltissimi bastoncini e solo pochi cocchi. Sul-l'agar Kuntze sono stati contati circa 210 milioni di bastoncini e 16 milioni di cocchi. Acidità 50,6° S.H.
12-18	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 18-1-1940. Al microscopio si osservano moltissimi bastoncini ed assai pochi cocchi. Nell'agar Kuntze sono stati contati 180 milioni di bastoncini e 40 milioni di cocchi. Acidità 48° S.H.
19-24	Siero-fermento del caseificio C.M. prelevato il 12-2-1940. Al microscopio risulta composto quasi totalmente dai bastoncini. Nell'agar Kuntze sono stati contati circa 2400 milioni di bastoncini. Nella diluizione 1 : 10 milioni non sono state riscontrate colonie di cocchi. Acidità 51,6° S.H.
30-35	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 15-2-1942. Al microscopio quasi soli bastoncini. Nell'agar-siero-peptone (Dorner) circa 1800 milioni di bastoncini. Acidità 49,6° S.H.
40-42	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 13-8-1942. Al microscopio risulta composto quasi solamente da bastoncini diritti o leggermente ricurvi, isolati o riuniti a due a due per lo più ricchi di granuli. Si notano pochi cocchi. Acidità 42° S.H. Nell'agar siero-peptone sono stati contati circa 1400 milioni di bastoncini, mentre nella diluizione 1 : 10.000.000 non sono stati riscontrati cocchi.
36-37	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 10-8-1941. Acidità so,so S.H.
45-52	Siero-fermento prelevato nel caseificio C.R. il 13-11-1942; al microscopio sono stati osservati bastoncini e cocchi in rapporto di circa 5 : 1. Bastoncini diritti di diametro uniforme (0,8 - 0,9) lunghi per lo più 5-6, ma anche da 2-9 micron. Alcuni presentano granuli. Tanto nelle provette a chiusura Burri come nelle piastre coll'agar-siero-peptone (Dorner) sono stati contati più di 2.000 milioni di microbi, in gran parte rappresentati da bastoncini, i quali - dopo 72 ore a 41° C. - davano colonie di 1 mm. ramificate come le radici un po' corte di un albero (10 x). Acidità 31° S.H.
53-36	Siero-fermento prelevato nel caseificio O. il 17-11-1942. Al microscopio sono stati osservati bastoncini e cocchi in rapporto 10 : 1. Bastoncini di 0,6-0,9 micron x 1,5-7 micron (la maggioranza 3-4 micron) quasi sempre isolati, raramente due a due. Sono stati contati circa 1600 milioni di microbi per cc. rappresentati da bastoncini lattici ad eccezione di circa 180 milioni rappresentati dai gassogeno-coagulanti di Dalla Torre. Acidità 46,2° S.H.
62-63	Siero-fermento prelevato nel caseificio C. il 14-11-1942. Sono stati contati circa 1.200 milioni di bastoncini. Al microscopio sono stati osservati solo bastoncini assai uniformi, delle dimensioni di 0,7-0,8 x 2-6 micron, diritti, isolati o due a due. Acidità 54,6° S.H.

**C O N S O R Z I O
P R O D U T T O R I
L A T T E DI M I L A N O**

primo esempio di un organismo volontario sorto in Italia per incrementare la produzione lattiera e per attuare norme e direttive tecniche igieniche nei rapporti del problema del "buon latte", da destinarsi ai rifornimenti dei maggiori centri urbani.

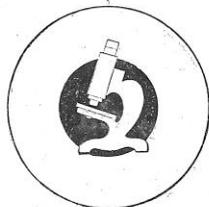
*Soltanto un macchinario moderno
consente una lavorazione razionale*

BRAP

- Impianti completi per tutte le lavorazioni del latte.
- Elettropompe Triumphator
- Scrematrici Triumphator
- Tele ritorte Morgenthaler
- Tele industriali

BRAP - Corso Milano 12a - Tel. 4019 - MONZA

CENTRO SPERIMENTALE DEL LATTE



- Fermenti selezionati per tutti i formaggi tipici
- Culture acidificanti ed aromatizzanti per burro
- Tutte le analisi microbiologiche e chimiche del latte e dei latticini
- Muffe selezionate per gorgonzola
- Consulenze tecniche scientifiche per l'industria lattiero casearia

MILANO - PARCO RAVIZZA - VIA SALASCO, 4 - TEL. 51.208 - 50.715

b) PREPARAZIONE DEI TERRENI NUTRITIVI

Per l'isolamento dei termobatteri furono adoperati con ottimi risultati agar-siero-peptone e agar di Kuntze. Quest'ultimo fu, in seguito, abbandonato perchè filtra assai difficilmente e rimane sempre un po' torbido. All'inizio della sperimentazione si è provato a preparare l'agar-siero-peptone in due modi: aggiungendo peptone ed agar direttamente al siero di grana disalbuminizzato e seguendo le indicazioni di Demont e Dorner (1). Nel primo caso le colonie non si sviluppano sempre bene, mentre coll'agar-siero peptone, preparato con sistema Demont e Dorner, si ottennero sempre e costantemente buoni risultati. Quest'ultimo si prepara nel seguente modo: si preleva dalla caldaia, appena estratto il formaggio, il siero residuo della fabbricazione del grana e si addiziona 1,5 % di sale di cucina; si tiene in autoclave per un'ora a 105° C. e, dopo aver lasciato riposare per 24 ore, si filtra. A parte si sciolgono in autoclave a 120° C. gr. 24 di agar in 1100 cc. di acqua potabile; si aggiungono al liquido caldo gr. 12 di peptone Witte, gr. 2 di fosfato bisodico e cc. 400 di siero trattato nella maniera sopra indicata. (E' bene sciogliere il peptone nel siero prima di aggiungerlo alla soluzione contenente l'agar). Si porta il pH a 6,8 e si aggiungono dei chiari d'uovo sbattuti con un po' d'acqua; si riscalda nuovamente il liquido in autoclave a 108° C. circa per un quarto d'ora, dopo di che si filtra e si sterilizza a 100° C. per 20'. Se la preparazione viene eseguita bene, tanto il siero quanto l'agar contenente le chiare d'uova filtrano assai rapidamente e risultano perfettamente limpidi. Una parte dell'agar veniva solidificata nelle provette a forma di becco di clarino in modo che la parte superiore del terreno rimaneva distante circa 5 cm. dall'orlo della provetta.

L'agar di Kunze si prepara nel seguente modo: si sciolgono cc. 100 di acqua, gr. 8 di lattosio e gr. 3 di agar e, dopo, si aggiungono cc. 200 di latte magro e gr. 3 di peptone. Si scalda a 100° C., si filtra, si riscalda nuovamente e si filtra un'altra volta. Senza neutralizzare, si sterilizza a 100° C. per 15' per tre giorni.

Anche nella ricerca della capacità fermentativa degli zuccheri sono stati provati due tipi di terreni base: uno indicato da Kantardjjeff (2) (usato anche da Demeter e Schmid) e l'altro da Burri (3) parzialmente modificato.

In un primo tempo è stato adoperato il terreno proposto da Kantardjjeff (acqua di lievito al 10 % privata di zuccheri con un ceppo di *Bact. coli* e aggiunta di 0,1 % di peptone), in seguito invece fu adottato solo quello di Burri (in parte modificato), perchè nel primo alcuni ceppi si sviluppavano assai stentatamente.

(1) Demont e Dorner: *loco cit.*

(2) Kantardjjeff: *loco cit.*

(3) Burri: *loco cit.*

Burri indica la seguente formula:

- acqua	cc. 1000
- Peptone Witte	gr. 10
- Peptone Merck	» 10
- Estratto di carne (Oxo Bouillon)	» 5
- Lievito autolisato (Difco)	» 5

pH = 6,0

Detto terreno fu parzialmente modificato come segue: l'acqua e lievito autolisato furono sostituiti coll'acqua di lievito al 15 % (in un litro d'acqua si fecero bollire gr. 150 di lievito compresso e si lasciarono riposare per due giorni; per decantazione si separava il liquido dal deposito e si portava ad un litro), il peptone Merck con il peptone Acas e Oxo Bouillon con l'estratto di carne Liebig. Il liquido così preparato fu seminato con un ceppo di Bac. coli (per eliminare lo zucchero presente), dopo 24 ore di termostato corretto a pH 6,8 e aggiunto di un chiaro d'uovo sbattuto con un po' d'acqua, scaldato in autoclave e filtrato.

Per la propagazione e conservazione delle culture fu usato il latte magro, sterilizzato in autoclave a 115° C. per 15'.

c) ISOLAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CEPPI

I ceppi, in numero di 42, furono isolati da nove campioni di siero-fermento provenienti da due caseifici del lodigiano e uno del modenese, nei quali veniva fabbricato il formaggio grana uso reggiano. Il siero-fermento fu prelevato in primavera ed in estate, durante i periodi nei quali la lavorazione procedeva normale. I campioni presentavano un'acidità che oscillava tra i 48 e 51° S.H., tranne uno che aveva solo 42° S.H. Da quest'ultimo sono stati isolati i ceppi n. 40-41 e 42. I campioni di siero-fermento contenevano da circa seicento milioni a circa due miliardi di microbi per cc., rappresentati quasi esclusivamente dai termobatteri; gli altri microbi, quasi costantemente presenti, appartenevano allo *Str. thermophilus* ed ai lieviti. Un paio di volte sono stati isolati i gassogeno-coagulanti di Della-Torre.

Per l'isolamento sono state fatte diluizioni in acqua sterile che venivano seminate in agar-siero-peptone preparato secondo Demont e Dorner (vedi pag. 21) e nell'agar di Kuntze. Dopo tre giorni di termostato, a 31° C., le colonie ben sviluppate ed isolate furono trapiantate nel latte magro.

Dalle provette nelle quali il latte venne coagulato si procedette, per la purificazione, alla semina dell'agar-siero-peptone inclinato a becco di clarino, incubando in anaerobiosi secondo il metodo Wright-Burri modificato da Ritter e Dorner. Dopo tre giorni di termostato a 37° C. si fece nuovamente il trapianto delle singole colonie.

Le culture pure, ottenute nel suddetto modo, furono trapiantate ogni dieci giorni nel latte magro e conservate a circa 4° C. La propagazione venne fatta a 40° C. e le culture si toglievano dal termostato appena avvenuta la coagulazione del latte.

d) FORMA DELLE CELLULE MICROBICHE

Per l'esame microscopico sono state adoperate le culture in latte magro appena coagulato e le colonie di 48 o 72 ore, sviluppatasi sull'agar-siero-peptone inclinato a becco di clarino, nelle provette con chiusura anaerobica di Wrigh-Burri modificata da Ritter e Dorner, oppure sullo stesso terreno in scatole Petri (1).

Oltre all'esame a fresco, furono allestiti preparati colorati con il metodo di Gram, con bleu di Löffler (in particolar modo per la ricerca dei granuli di volutina) seguito dalla immersione nella soluzione di acido acetico al ½ %, e con bleu di china. Come è già stato dimostrato altrove dallo scrivente (2), il metodo di bleu di china si presta assai bene per la colorazione di microbi provenienti dalle colonie, inquantochè il fondo del preparato rimane uniformemente colorato in bleu, mentre le cellule microbiche rimangono incolori.

e) FORMA DELLE COLONIE

L'esame delle forme delle colonie fu eseguito sulle culture allestite col l'agar-siero-peptone, in scatole Petri od a becco di clarino con chiusura anaerobica di Wright-Burri modificata da Ritter e Dorner.

Detta chiusura dà dei risultati realmente soddisfacenti nelle culture di microbi che si sviluppano di preferenza in anaerobiosi; si ottiene spingendo nella provetta, per qualche centimetro dal bordo, il tappo di cotone previamente tagliato all'altezza del bordo, poi si introduce un batuffolo di cotone idrofilo, versandovi sopra un cmc. della soluzione di pirogallolo al 20 % e un cmc. della soluzione di carbonato sodico al 25 % (anidro); si chiude immediatamente con un tappo di gomma umido. Le colonie dei termobatteri così ottenute, presentano, per singoli ceppi, alcuni caratteri differenziali facilmente individuabili ad occhio nudo o con una lente a 10 ingrandimenti.

f) TEMPO DELLA COAGULAZIONE DEL LATTE

Il latte magro sterile, contenuto nelle provette in ragione di 10 cc. cadauna, si innestava con 0,1 cc. di cultura appena coagulata. Si teneva in termostato a 40° C., controllando ogni ora la consistenza del liquido, senza scuotere le provette.

g) DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ACIDITA' NEL LATTE E NEL SIERO-PEPTONE

Nelle boccette della capacità di circa 100 cc. contenenti 50 cc. di latte magro o siero-peptone, si innestava cc. 0,1 di cultura in latte e si teneva a 37° C. per 10 giorni. La titolazione si faceva con la soluzione decimale di NaOH su 10 cc. di coagulo ben sbattuto. Per ogni ceppo in esame, venivano innestate contemporaneamente due boccette perchè si è

(1) Ritter W. e Dorner W.: «Zentralbl. f. Bakter.», 1 Abt., Vol. 125, pag. 379

(2) Renco P.: *Ricerche su un fermento lattico sporigeno*. Annali di microbiologia, 1942.

TABELLA B 1

Ceppo n.	Forme microbiche su agar-siero-peptone in anaerobiosi (Wright-Burri mod. Ritter e Dorner)	Forme microbiche su agar-siero-peptone. Da colonie superficiali in aerobiosi	Forme microbiche nel latte magro
1	Bastoncini dritti di forma regolare ed uniformi di $1,8 \times 4-9 \mu$, isolati o riuniti due a due; spesso a forma di V.	Bastoncini di $0,4-0,6 \mu \times 1,5-4,0 \mu$, isolati, due a due o in brevi catenelle, di forma regolare, dritti o leggermente ricurvi.	Bastoncini di $0,9-1,1 \times 3-7 \mu$ isolati o riuniti in brevi filamenti di circa $15-25 \mu$.
3	Bastoncini dritti o leggermente ricurvi di $0,5-1,0 \times 2-7 \mu$, isolati o riuniti due a due, raramente in brevi filamenti che misurano da 15 a 20μ circa.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
5	Come ceppo n. 3	Come ceppo n. 3	Come ceppo n. 1 dal quale differiscono per lo spessore che è di $0,5-0,6 \mu$.
6	Bastoncini dritti, di spessore uniforme di $0,4 \times 3-4 \mu$, isolati, ma per lo più in brevi filamenti.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
7	Come ceppo n. 1, dal quale differiscono per lo spessore che è di circa $1,0 \mu$.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
9	Bastoncini di $0,6-0,8 \times 2-7 \mu$ per lo più ricurvi, isolati o in brevi catene, nelle quali si distinguono i singoli elementi. Pochi irregolarmente ricurvi, attorcigliati e più o meno rigonfiati.	Bast. di $0,4-0,6 \times 2,0-6,0 \mu$ isolati o riuniti due a due o talvolta in brevi catenelle quasi sempre ricurvi, talvolta attorcigliati.	Bastoncini dritti isolati o riuniti due a due di $0,4-0,5 \times 3-5 \mu$.
10	Bastoncini di spessore irregolare di $0,5-0,6$ e' di $0,8-1,0 \mu$ sempre ricurvi, isolati o riuniti due a due.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1
11	Bastoncini dritti o leggermente ricurvi del diametro regolare di $0,6-0,7 \mu$ per lo più lunghi $8-12 \mu$ talvolta riuniti in brevi filamenti di $16-20 \mu$.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 5.
12	Bastoncini dritti assai uniformi di $0,5-0,6 \times 1,5-5 \mu$, isolati, riuniti due a due o in catenelle di tre.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1 dal quale differiscono per i filamenti alquanto lunghi (circa 60μ).
14	Come ceppo n. 12.	Come ceppo n. 12.	Come ceppo n. 1.
15	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.	Bastoncini di $0,8-0,9 \times 3-6 \mu$ dritti, isolati o riuniti due a due, ma per lo più in filamenti di $12-20 \mu$.

TABELLA B₂

Ceppo N.	Forme microbiche su agar-siero-peptone in anaerobiosi (Wright-Burri mod. Ritter e Dorner)	Forme microbiche su agar-siero-peptone. Da colonie superficiali in aerobiosi	Forme microbiche nel latte magro
16	Bastoncini di spessore vario tra 0,4 e 0,9 μ ricurvi attorcigliati e talvolta a forma di spirale. Alcuni irregolarmente rigonfiati.	Come ceppo n. 9.	Come ceppo n. 5.
17	Come ceppo n. 7.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
18	Come ceppo n. 12.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
19	Come ceppo n. 16.	Come ceppo n. 9.	Come ceppo n. 16
20	Come ceppo n. 3 dal quale si differenziano per lo spessore che è di 0,4-0,6 μ .	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 6.
21	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
31	Bastoncini quasi sempre in filamenti o in catene, ricurvi talvolta in forma di piccoli anelli. Spessore variabile da 0,7 a 1,3 μ .	Bastoncini di 0,3-1,1 \times 1,2-4,0 μ diritti o ricurvi, talvolta attorcigliati, quasi sempre isolati o due a due, raramente riuniti in brevi catene.	Bastoncini da 0,8-1,0 \times 4,0-11,0 μ isolati o riuniti due a due, talvolta in lunghi filamenti.
40	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.
41	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.
42	Come ceppo n. 31, dal quale si differenziano per lo spessore che è uniforme e di 0,7 μ .	Filamenti dello spessore di 0,5-0,6 μ , per lo più ricurvi, raramente attorcigliati.	Come ceppo n. 31.
32	Bastoncini di 0,8-1,2 \times 3,5 μ , tozzi, raramente diritti, per lo più ricurvi, alcuni di questi ultimi ingrossati, a forma di clava.	Come ceppo n. 42.	Bastoncini di 0,8-0,9 \times 3,0-7,0 μ , isolati o riuniti due a due, talvolta in brevi catenelle.
33	Come ceppo n. 32.	Come ceppo n. 42.	Come ceppo n. 32.
34	Come ceppo n. 32.	Come ceppo n. 42.	Come ceppo n. 32.
35	Bastoncini di 0,7-0,8 \times 3-8 μ isolati o riuniti due a due, quasi sempre diritti, raramente un po' ricurvi.	Come ceppo n. 42.	Come ceppo n. 32.
36	Come ceppo n. 35.	Bastoncini di 0,4-0,6 \times 4,9 μ o più quasi sempre diritti, talvolta leggermente ricurvi, isolati o riuniti due a due, raramente in brevi filamenti.	Bastoncini di 0,6-0,9 \times 3-1,2 μ , per lo più isolati, talvolta in brevi filamenti.

TABELLA B₃

Ceppo N.	Forme microbiche su agar-siero-peptone in anaerobiosi (Wrigh-Burri mod. Ritter e Dorner)	Forme microbiche su agar-siero-peptone. Da colonie superficiali in aerobiosi	Forme microbiche nel latte magro
37	Come ceppo n. 35.	Come ceppo n. 36, dal quale differiscono per frequenti catenelle e filamenti.	Come ceppo n. 36.
62	Bastoncini di dimensioni assai regolari di 1,0-1,2 x 3-12 μ , dritti e quasi sempre isolati, raramente riuniti a due a due.	Come ceppo n. 31.	Bastoncini di spessore assai variabile, tra 0,6 e 1,5, lunghi 5-7 μ , dritti, quasi sempre in brevi filamenti.
63	Bastoncini di spessore variabile tra 0,6 e 1,3 μ per lo più lunghi di 10 a 20 μ , un po' ricurvi.	Come ceppo n. 31.	Bastoncini di 0,8-1,0 x 5-7 μ , dritti, quasi sempre isolati, raramente in brevi filamenti.
45	Filamenti del diametro di 0,8-0,9 μ , lunghi per lo più 20-40 μ , leggermente ricurvi.	Filamenti di 0,4-0,8 μ assai lunghi, ricurvi e talvolta attorcigliati.	Bastoncini dritti o leggermente ricurvi di 0,7 x 2-5 μ , isolati o riuniti due a due o in lunghissimi filamenti (più di 100 μ).
46	Filamenti di 0,6-0,9 μ , assai ricurvi e spesso contorti.	Come ceppo n. 45.	Bastoncini dritti o leggermente ricurvi, di 0,7 x 2,5 μ isolati, riuniti due a due o in brevi catenelle.
47	Come ceppo n. 46, dal quale differiscono per alcuni filamenti leggermente ricurvi.	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 45.
48	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 45.
49	Come ceppo n. 46.	Come ceppo n. 45.	Lunghi filamenti del diametro di 0,9-1,0 μ .
50	Come ceppo n. 46.	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 49.
52	Come ceppo n. 46, dal quale differisce per il diametro dei filamenti che è assai costante di 0,6 μ .	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 49.
53	Brevi filamenti di diametro costante di 0,6 μ , assai contorti ed attorcigliati, talvolta a forma di anello (il diametro degli anelli è in media di 4-5 μ).	Bastoncini di 0,4-0,6 x 2-6 μ , riuniti in brevi catene o in brevi filamenti, quasi sempre ricurvi, raramente attorcigliati.	Come ceppo n. 46.
54	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 49.
55	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 46.
56	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 45.

constatato che, nelle identiche condizioni, lo stesso ceppo produceva gradi di acidità variabili sino a 0,15° Thörner (cc. 1,5 di Na OH decinormale per ogni 10 cc. di terreno).

h) CAPACITA' DI FERMENTARE GLI ALCOLI E GLUCIDI

In un primo tempo fu adoperato il terreno indicato da Kantardjjeff ed adottato anche da Demeter e Schmid (vedi pag. 21), ma questo dovette essere abbandonato perchè molti ceppi si sviluppavano assai stentatamente o non si sviluppavano affatto anche quando veniva addizionato lo zucchero. In seguito fu adoperato, con ottimo successo, il terreno base di Burri e Kollmann parzialmente modificato (vedi pag. 22). Lo zucchero veniva aggiunto in ragione del 2 % al terreno base, che veniva distribuito nelle provette in ragione di 10 cc. cadauna e sterilizzato a 100° C. per 15' per tre giorni consecutivi. Per ogni provetta si innestava un'ansata (fu adoperata un'ansa avente un filo con 0,5 mm. di diametro e il diametro interno dell'occhiello di 2 mm.) di cultura in latte magro freschissima. Dopo 10 giorni di permanenza in termostato a 37° C., si titolava l'acidità prodotta con la soluzione decinormale di idrato di sodio.

La ricerca si ripeteva dopo dieci giorni circa e nei casi dubbi anche due o tre volte. Per ogni esame fu fatta sempre anche una prova di controllo, perchè è risultato che i ceppi acidificavano, se pur leggermente, anche in terreno base non aggiunto di zucchero. Tale produzione di acidità (per la neutralizzazione della quale occorre da 0,2 a 0,8 cc. di Na OH decinormale per ogni 10 cc. di terreno) è quasi sicuramente dovuta a tracce degli zuccheri presenti nel terreno base, zuccheri che non potevano essere eliminati senza pregiudicare l'andamento della ricerca, perchè è stato constatato che, nel terreno base nel quale non si verificava alcuna acidificazione, questa mancava talvolta anche per alcuni zuccheri (come ad es. galattosio, glucosio, maltosio), a spese dei quali, nel terreno base contenente tracce di zuccheri, veniva prodotta una notevole quantità di acidi. Ciò fu constatato anche da Karnicki e Dorner (1) i quali affermano essere noto che alcuni batteri, in presenza di tracce di zuccheri fermentescibili, sono in grado di attaccare sostanze che altrimenti non vengono fermentate o assai debolmente.

Inoltre, nel corso dell'esperienza, veniva osservato un altro fatto di una certa importanza e precisamente che gli stessi ceppi, nelle identiche condizioni di sviluppo, producevano diversi gradi di acidità, acidità che oscillava da 0,01-0,03° Thörner (cioè da 0,1-0,3 cc. di Na OH decinormale necessari per neutralizzare 10 cc. di terreno).

Di questo fatto si è dovuto tener conto nella valutazione della capacità fermentativa dei singoli ceppi, interpretando come dubbi tutti i casi, nei quali la produzione di acidità non superava i 0,3° Thörner in più della stessa, titolata nel terreno base privo di zucchero.

(1) Karnicki e Dorner: *loco cit.*

(2) Grado Thörner = 1 cc. di Na OH normale capace di neutralizzare l'acid. in 100 cc. di liquido.

i) DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' OTTICA DELL'ACIDO LATTICO

Per determinare l'attività ottica dell'acido lattico, bisogna ottenere il lattato di zinco puro. Per tale scopo si procedette nel seguente modo. Si allestirono le culture in circa mezzo litro di latte magro, aggiunto di carbonato di calcio. Dopo dieci giorni di termostato a 40° C. e frequenti agitazioni giornaliere, si scaldavano le culture a bagnomaria e si filtravano. Nel filtrato si attaccava il lattato di calcio coll'acido solforico e si filtrava per allontanare il solfato di calcio, poi si provvedeva all'estrazione dell'acido lattico coll'etere. Eliminato l'etere, per distillazione, si diluiva l'acido lattico così ottenuto, non perfettamente puro, coll'acqua calda e si aggiungeva il carbonato di piombo, scaldando tutto a bagnomaria sino alla neutralizzazione. Si filtrava e dal filtrato si eliminava il piombo coll'idrogeno solforato. Si filtrava nuovamente, si concentrava a bagnomaria sino a scacciare tutto l'idrogeno solforato e si aggiungeva il carbonato di zinco facendo bollire per qualche minuto. Si filtrava e si concentrava il filtrato a piccolo volume al quale si aggiungeva alcool etilico in due riprese (in tutto circa tre volte il liquido contenente il lattato di zinco) e si lasciava raffreddare. Dopo un riposo di almeno cinque ore, si filtrava lavando il precipitato, prima coll'alcol è poi coll'etere. L'etere veniva eliminato in stufa a 55°C. ed il lattato di zinco così ottenuto veniva esaminato al polarimetro.

l) PRODUZIONE DELLA CATALASI

Nelle provette della capacità di circa 20 cc. si allestivano le culture in latte magro o in siero peptone in ragione di 10 cc. di cultura per provetta. Dopo 2 e sei giorni di incubazione a 40° C. si determinava la catalasi nel seguente modo: nella stessa provetta la cultura veniva energicamente agitata dopo l'aggiunta di 5 cc. di acqua per renderla ben liquida ed omogenea, poi si versava, sino a ricoprire quasi totalmente la provetta, l'acqua ossigenata al 3,6% (12 vol.); dopo una breve e rapida agitazione si chiudeva con un tappo di gomma forato portante un tubicino di vetro piegato ad S, onde permettere di sfuggire al liquido spostato dal gas eventualmente formatosi nella provetta capovolta.

La lettura veniva eseguita dopo 5, 12 e 24 ore di permanenza a circa 20° C.

m) DETERMINAZIONE DI TEMPERATURE OTTIME, MINIME E MASSIME DI SVILUPPO

A tale scopo si allestivano culture in latte magro e siero-peptone a temperature 20, 22, 25, 30, 37, 40, 45, 49, 51, 52, 53° c., alle quali si tenevano, per la ricerca delle massime e delle minime temperature di sviluppo, per una durata di quindici giorni. Come indice di temperatura ottima serviva il tempo impiegato per la coagulazione, mentre l'intorbidamento (con il relativo esame microscopico) del siero-peptone indicava temperature minime e massime di sviluppo.

n) RICERCA DEL POTERE PROTEOLITICO

Nei palloncini tarati della capacità di 250 cc. si allestivano le culture in latte intero addizionato di carbonato di calcio precipitato. Il latte proveniente da tre o quattro vacche e munto asetticamente veniva distribuito nei palloncini tarati da 250 cc. in ragione di cc. 100 per ogni palloncino nel quale si trovava carbonato di calcio sterile. Il latte venne sterilizzato per tre volte in tre giorni a vapore fluente per 15' alla volta. Per la prova della sterilità i palloncini rimasero a 31° per 15 giorni; dopo di che vennero innestati tutti con una cultura fresca in latte magro in ragione di 1 cc. di cultura per ogni palloncino.

Per le prove in bianco si procedette immediatamente alla determinazione dell'azoto solubile, mentre gli altri palloncini vennero tenuti per 24 ore a 40° C e 24 ore a 30° C. ed agitati in media ogni tre ore.

In seguito le culture così ottenute vennero tenute alla temperatura di 18-20° C. e giornalmente per tre o quattro volte agitate.

Dopo di ciò si eseguì la ricerca dell'azoto solubile con il metodo Kjeldahl sul filtrato limpido, dopo aver precipitato i protidi a caldo coll'aggiunta di acido acetico.

4. - Risultati delle ricerche

a) FORMA DELLE COLONIE SULLA SUPERFICIE DELL'AGAR-SIERO-PEPTONE IN AEROBIOSI

Sono stati notati sostanzialmente cinque tipi che si differenziano tra loro più o meno spiccatamente:

- A) Colonie sottili, rotonde, bianchicce e trasparenti. Diametro circa 0,5-0,7 mm. A 10_x, struttura uniforme o finemente cristallina, margine quasi sempre liscio, talvolta un po' ondulato. Sono più o meno iridescenti.
- B) Colonie assai simili al tipo A, dal quale differiscono per la struttura nettamente cristallina.
- C) Colonie rotonde, bianchicce e trasparenti, del diametro di circa 1 mm., con il margine più o meno spiccatamente ispessito a forma di anello. A 10_x, il centro sembra vuoto o di struttura nettamente cristallina; il margine ispessito a forma di anello è liscio o leggermente ondulato verso l'esterno. A 90_x, risultano uniformemente e finemente cristalline (come del resto tutte le colonie dei termobatteri) un po' più trasparenti verso il centro.
- D) Colonie rotonde, bianche e spesse del diametro di mm. 1 abbondante. A 10_x presentano la struttura nettamente cristallina a margine liscio.
- E) Colonie di forma irregolare, sottili, bianchicce e trasparenti. Diametro di circa un mm. A 10_x, tipo « caput medusae » cioè presentano i prolungamenti a forma di masse di capelli ondulati.
- F) Colonie rotondeggianti, sottili e trasparenti con il d = 1,5-2 mm. A 10_x, il centro grossolanamente cristallino è più trasparente del margine che ri-

sulta finemente granuloso e lobato. A 90_x, struttura finemente granulosa con linee ricurve più scure, margine debolmente ed irregolarmente lobato.

Alla osservazione microscopica tutti i tipi, eccetto D, sono caratterizzati dalla trasparenza, dovuta ad uno spessore estremamente ridotto. Si suppone che ciò sia dovuto alla non buona tolleranza di ossigeno, perchè, sullo stesso terreno in anaerobiosi, le colonie si presentano quasi sempre alquanto spesse.

b) FORMA DELLE COLONIE SULLA SUPERFICIE DELL'AGAR-SIERO-PEPTONE IN ANAEROBIOSI (chiusura anaerobica di Wright-Burri, modificata da Ritter e Dorner).

Sono stati riscontrati otto tipi di colonie che però, macroscopicamente, presentano assai lievi differenze; queste diventano più nette quando vengono osservate a dieci ingrandimenti.

AA - Colonie rotonde, bianche, spesse, a forma di goccia, con lucentezza umida, del diametro di 1-1,5 mm. A 10_x mostrano margine liscio e struttura:

- a) finemente cristallina;
- b) grossolanamente cristallina;
- c) uniforme.

BB - Colonie rotondeggianti di colore bianco-giallo sporco, più spesse verso il centro, dove assumono la colorazione più intensa. Il diametro è di 1-2 mm. A 10_x presentano il margine ondulato e struttura:

- a) finemente cristallina;
- b) grossolanamente cristallina.

CC - Colonie rotonde, a forma di disco, di spessore uniforme, assai sottili, quasi trasparenti. A 10_x, struttura finemente cristallina.

DD - Come AA., solamente più grandi (d = 2 mm.), più spesse e non perfettamente rotonde. A 10_x struttura finemente cristallina.

EE - Colonie rotonde, bianchicce, con il margine ispessito e con il centro quasi trasparente, in modo da assumere la forma di anello. A 10_x il centro sembra vuoto o assai sottile con struttura granulosa; verso l'esterno il margine presenta i contorni ondulati. Sono quasi uguali al tipo C (che si riscontra sullo stesso terreno in aerobiosi).

c) FORME MICROBICHE NELLE COLONIE SUPERFICIALI NELL'AGAR-SIERO-PEPTONE

Le forme microbiche provenienti dalle colonie ottenute, dai vari ceppi, in aerobiosi ed anaerobiosi, non presentano in genere grandi differenze. Unica sostanziale differenza consiste nel fatto che alcuni ceppi formano, in anaerobiosi, colonie, nelle quali si presentano come bastoncini di forma e dimensioni assai regolari, diritti o riuniti a due a due, il che non si

verifica mai per le forme provenienti dalle colonie sviluppatesi in aerobiosi. In quest'ultimo caso i bastoncini della stessa colonia sono talvolta dritti, talvolta un po' ricurvi e non di rado uniti in catenelle.

Le forme che hanno l'assoluta predominanza tanto nelle colonie in aerobiosi, quanto in anaerobiosi, sono i bastoncini per lo più riuniti in catenelle o filamenti più o meno ricurvi, talvolta contorti o attorcigliati anche a forma di anello. Non mancano neppure le forme irregolarmente rigonfiate. Lo spessore dei bastoncini è assai vario: alcuni sono relativamente sottili (circa 0,4 micron) altri relativamente spessi (1,2 micron).

Come risulta dalla tabella B le forme di quasi tutti i ceppi, provenienti dalle colonie sviluppatesi in aerobiosi, presentano differenze più o meno forti con le forme degli stessi ceppi provenienti dalle colonie ottenute in anaerobiosi.

d) FORME MICROBICHE NEL LATTE MAGRO.

Anche nel latte magro, come risulta dalla tabella B, i termobatteri prendono diverse forme. Generalmente si presentano sotto forma di filamenti più o meno lunghi, accompagnati da un numero più o meno forte di bastoncini isolati. Altre volte invece formano catene più o meno lunghe nelle quali si possono distinguere bene i singoli bastoncini; le catene generalmente non sono numerose e risultano circondate da molti bastoncini per lo più isolati o riuniti a due a due.

Non mancano infine ceppi che si presentano solamente come bastoncini isolati o riuniti due a due. Anche in questo caso lo spessore dei bastoncini è alquanto vario. Non sono state mai riscontrate forme ipertrofiche o attorcigliate.

Non succede di rado che lo stesso ceppo, nelle identiche condizioni di temperatura, terreno nutritivo ed in genere in tutte le altre condizioni di sviluppo si presenti, in una provetta, sotto forma di bastoncini isolati o riuniti due a due, mentre, nell'altra, sotto forma di filamenti. Detto caso, ripetutamente osservato, riguarda in particolar modo il ceppo 16. Lo scrivente ha riscontrato un analogo comportamento in un ceppo appartenente al *Tbm. bulgaricum* isolato dallo jogurt originale, proveniente dalla Bulgaria.

e) ACIDIFICAZIONE DEI GLUCIDI E DEGLI ALCOLI

Come risulta dalla tabella, la capacità dei singoli ceppi di acidificare i glucidi ed alcoli è la seguente: tutti i ceppi esaminati, cioè 40, producono acidità, dal glucosio, mannosio e lattosio, 37 anche da galattosio (ad eccezione dei ceppi n. 53-54 e 55 che non fermentano quest'ultimo zucchero) e 33 ceppi acidificano anche il levulosio. Un discreto numero (precisamente 17) acidifica, oltre ai suddetti zuccheri, anche il saccarosio, mentre, solo 12 ceppi, sono capaci di attaccare il maltosio, seppure solo pochi con una certa intensità; del resto l'acidità prodotta da questi ultimi zuccheri è in genere assai basso. Questo basso grado di acidità si nota anche nei riguardi dei seguenti glucidi: xilosio, raffiniosio, destrina, amido e salicina.

Acidità prodotta dai

(cc. di NaOH decinormale)

CEPPO	Glicerina	Xiloso	Arabinoso	Ramnosio	Sorbito	Mannite	Levulosio	Glucosio	Mannosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Rafinosio	Inibitulina	Destrina	Amide	Salicina
1	—	—	—	—	—	—	3.2	6.4	10,2	6.8	—	0.6	9.2	—	—	0.4	—	—
3	—	—	—	—	—	—	4.8	5.3	3.5	5.1	—	0.1	8.3 7.0	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	7.2	6.3	10,2	6.2	—	—	9.6	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	1.0	4.2 6.0	3.1	—	—	3.8	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	2.6	5.8	2.6	6.3	—	1.4	7.9	—	—	0.5	—	—
9	—	1.2	—	—	—	—	2.0 2.3	9.2	1.6 3.6	9.1	—	1.5	4.3 7.0	0.2	—	1.6	0.3	—
10	—	—	—	—	—	—	3.4	7.4	4.2	7.1	—	0.6	6.7	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	4.1	8.0	7.0	7.1	—	—	4.8	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	3.4	7.2	4.1	6.8	—	—	4.5	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	2.5	9.8	3.2	10,8	—	0.8	7.6	—	—	0.4	—	—
15	—	—	—	—	—	—	3.9	7.1	3.3	7.6	—	—	13,2	—	—	—	—	—
16	—	0.3	—	—	—	—	2.0	6.3	3.0 3.4	6.0	—	0.3 1.5	4.4	—	0.6	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	6.4	10,2	9.0	11	—	0.6	13,8	—	—	0.4	—	—
18	—	—	—	—	—	—	8.2	7.4	4.4	6.3	—	—	13,2	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—	1.6	8.5	1.6	8.9	—	—	5.1	—	—	0.6	—	—
20	—	—	—	—	—	—	6.8	9.8	3.3	12,6	—	—	13,4	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	—	—	8.6	7.1	6.5	—	—	10,4	—	—	—	—	0.2
31	—	1.5	—	—	—	—	1.9	6.4	3.4	4.7	1.9 5.1	1.7	7.0	—	—	—	—	0.2
40	—	1.5	—	—	—	—	1.6	7.1	1.4	8.4	5.6	2.0	6.8	—	—	—	—	—
41	—	0.5	—	—	—	—	2.0	3.2	1.4	5.1	4.5	4.8	6.2	—	—	—	—	0.2

glucidi ed aleoli

per 10 cc. di terreno nutritivo)

CEPPO	Glicerina	Xilolo	Arabinosio	Ramnosio	Sorbito	Mannite	Levulosio	Glucosio	Mannosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Refinosio	Inulina	Destrina	Amido	Salicina
42	—	1.5	—	—	—	—	2.0	4.2	1.4	7.2	5.3	4.5	6.9	—	—	—	—	0.2
32	—	—	—	—	—	—	2.4	6.1	7.2	6.8	—	0.5	7.1	—	—	1.6	—	—
33	—	—	—	—	—	—	2.6	5.9	5.7	6.6	—	0.5	8.0	—	—	1.6	—	—
34	—	—	—	—	—	—	1.4	4.5	3.4	4.6	0.2	0.2	6.2	—	—	0.5	—	—
35	—	—	—	—	—	—	2.4	5.8	6.0	7.6	0.3	0.2	6.2	—	—	1.0	—	—
36	—	—	—	—	—	—	7.4	7.2	6.7	7.2	—	0.8	8.0	—	—	1.0	—	—
37	—	—	—	—	—	—	6.6	6.4	8.8	6.9	—	—	9.2	—	—	—	—	—
62	—	—	—	—	—	—	—	2.2	3.4	3.3	—	—	7.1	—	—	—	—	—
63	—	—	—	—	—	—	—	2.5	3.9	3.6	—	—	6.3	—	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	—	0.6	3.2	5.2	5.2	1.1	0.2	6.2	—	—	0.5	1.3	—
46	—	—	—	—	—	—	0.5	2.1	4.7	4.6	1.2	0.3	5.1	—	—	—	—	—
47	—	—	—	—	—	—	0.5	1.9	5.1	4.1	0.9	0.4	5.8	—	—	0.6	0.9	—
48	—	—	—	—	—	—	0.8	2.5	4.2	4.6	0.8	0.2	6.1	—	—	0.5	0.7	—
49	—	—	—	—	—	—	1.2	2.2	3.9	4.4	1.3	0.2	5.8	—	—	0.7	1.1	—
50	—	—	—	—	—	—	0.6	2.1	4.8	4.7	1.2	0.2	6.3	—	—	—	—	—
52	—	—	—	—	—	—	0.6	2.3	4.1	3.9	1.3	—	4.9	—	—	0.6	1.2	—
53	—	—	—	—	—	—	0.5	3.1	5.6	0.3 0.1	1.7	0.3	5.3 4.1	—	—	0.5	0.5	—
54	—	—	—	—	—	—	0.9	2.1	3.9	0.4	1.6	—	5.7	—	—	—	—	—
55	—	—	—	—	—	—	1.0	2.4	4.7	0.2	1.5	0.3	4.5	—	—	0.6	0.5	—
56	—	—	—	—	—	—	0.9	2.3	4.9	0.2	1.3	0.4	2.8	—	—	0.6	0.5	—

Senza tener conto dell'intensità di acidificazione, e, considerando i casi dubbi senz'altro come negativi, (dato il grado di acidità da loro prodotta assai basso) i ceppi esaminati si possono dividere nei seguenti undici gruppi:

<i>Gruppi</i>	<i>Sostanze fermentate</i>	<i>N. dei ceppi</i>
I	6-21-62-63 Glucosio, mannosio, galattosio, lattosio	4
II	3-5-11-12-15-18-20-37 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, lattosio	8
III	10-46-50-54 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, lattosio	4
IV	34-35 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, lattosio, destrina	2
V	53-55-56 Levulosio, glucosio, mannosio, saccarosio, lattosio, destrina, amido	3
VI	1-7-14-17-32-33-36 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio, destrina	7
VII	45-47-48-49-52 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, lattosio, destrina, amido	5
VIII	31-40-41-42 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio	4
IX	16 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio, inulina	1
X	19 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, lattosio, destrina	1
XI	9 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio, destrina	1

f) QUALITA' DELL'ACIDO LATTICO PRODOTTO

Dato il procedimento assai lungo e di valore alquanto relativo (vedi pag. 15) che si attribuisce oggi all'attività ottica dell'acido lattico prodotto dalle singole specie, questa è stata determinata solo per quattro ceppi considerati per l'assieme di altri caratteri i più tipici.

Nella tabella sono riportati i risultati

<i>Ceppo N.</i>	<i>Lattato di zinco sciolto in 100 cc. di acqua - gr.</i>	<i>Acqua di cristallizzazione %</i>	<i>Angolo di deviazione</i>	<i>Lunghezza del tubo 400 mm. Temperat. di osservazione 25° C.</i>
9	1,1244	13,96	+ 0,42	
53	1,0730	13,42	+ 0,41	
47	1,2929	13,61	+ 0,53	
34	1,1725	11,59	0,00	

Dalla tabella risulta che i ceppi n. 9, 53 e 47 producono acido lattico levogiro, mentre il ceppo n. 34 acido lattico inattivo.

g) IL POTERE PROTEOLITICO

La capacità di solubilizzare la caseina del latte è stata ricercata per otto ceppi, scelti tra quelli più numerosi e più frequenti che si riscontravano nel siero-fermento. Dopo una serie di prove preliminari, furono allestite le culture in latte intero sterile ed aggiunto di carbonato di calcio precipitato. Dopo aver ottenuto un energico sviluppo dei microbi tenendo per 24 ore il latte innestato a 40° e poi per altre 24 ore a 30°, le culture furono lasciate per sei settimane a 18-20° C. (temperature alle quali i ceppi in esame non presentavano più alcuno sviluppo).

Come risulta dalla tabella tutti gli otto ceppi hanno attaccato le proteine del latte portando l'azoto solubile dello stesso da 0,061-0,065 % (presente nel latte al momento di innesto) a un minimo di 0,111 % e ad un massimo di 0,218 %.

<i>Ceppo N.</i>	<i>% di N solubile nella cultura in latte + CaCO₃</i>	<i>% di N solubile nel latte adoperato per la cultura</i>	<i>Ceppo N.</i>	<i>% di N solubile nella cultura in latte + CaCO₃</i>	<i>% di N solubile nel latte adoperato per la cultura</i>
16	0,164	0,065	34	0,159	0,065
31	0,161	0,065	35	0,191	0,061
42	0,176	0,065	45	0,111	0,061
52	0,218	0,065	62	0,192	0,061

h) LA CATALISI E LA RIDUZIONE DEI NITRATI

Nessuno dei ceppi studiati ha mai dato luogo alla produzione della catalasi, altrettanto non si è avuta in alcun caso la riduzione dei nitrati in nitriti.

i) LA PRODUZIONE DEI GRANULI METACROMATICI O DI VOLUTINA

Come risulta dalla tabella n. 5 alcuni ceppi contengono granuli metacromatici. Si è potuto constatare che la produzione di detti granuli risulta costante.

k) LA TEMPERATURA DI SVILUPPO E LA PRODUZIONE DI ACIDO LATTICO

Per tutti i ceppi le temperature minime di sviluppo oscillavano tra i 20 e 22° C., mentre le massime tra i 49-52° C.

Come risulta dalla tabella n. 5 una particolare attenzione è stata fatta ai ceppi capaci di svilupparsi ancora a 51° C., temperatura tenuta in massima considerazione da Burri e Kollmann agli effetti della classificazione dei singoli ceppi. Si è potuto constatare, dopo un anno circa di trapianti, che tutti i ceppi studiati si comportavano in modo assai costante nei riguardi delle temperature massime di sviluppo.

La quantità di acido lattico risulta relativamente poco forte ed in generale il gruppo si presenta abbastanza omogeneo. Come risulta dalla tabella n. 5 l'acidità minima prodotta nel latte è stata di 12,8° Thörner per il ceppo 52, mentre la massima era di 37,1° Thörner per il ceppo 35. Costantemente e notevolmente più bassa è stata l'acidità prodotta nel siero-peptone.

5. - Classificazione di ceppi isolati

Secondo Orla Jensen (4) la differenza sostanziale che permette di distinguere le singole specie dei termobatteri consiste nella capacità di fermentare determinati glucidi ed alcoli con la formazione di acido lattico. Altre differenze riguardano la qualità e quantità dell'acido lattico prodotto, la forma delle colonie e la produzione di granuli di volutina.

Ecco le caratteristiche dei singoli termobatteri secondo Orla Jensen (1).

Tbm. lactis:

- a) acidifica galattosio, mannosio, saccarosio, maltosio, lattosio e salicina;
- b) produce acido lattico levogiro con un massimo di 1,7 %;
- c) non produce quasi mai colonie tipo « caput medusae ».

Tbm. helveticum - differisce dal *Tbm. lactis* perchè:

- a) non fermenta mai saccarosio, raffinosisio, inulina e salicina, ma fermenta sempre maltosio, destrina e amido;
- b) produce acido lattico inattivo con un massimo di 2,0-2,75 %;
- c) forma colonie quasi sempre del tipo « caput medusae ».

(1) S. Orla Jensen: *loco cit.*

Tbm. intestinale - differisce dal *Tbm. lactis* perchè:

- a) produce acido lattico inattivo puro o con un'aggiunta di levogiro;
- b) produce colonie del tipo « caput medusae ».

Tbm. jugurt - differisce dal *Tbm. helveticum* perchè:

- a) non fermenta maltosio, destrina e amido;
- b) produce acido lattico inattivo con un massimo di 2,7 %;
- c) non produce granuli.

Tbm. bulgaricum - differisce dal *Tbm. jugurt* perchè:

- a) produce al massimo 1,7% di acido lattico;
- b) produce acido lattico levogiro;
- c) è ricco di granuli;
- d) dà quasi sempre colonie del tipo « caput medusae ».

Secondo Burri e Kollmann (1) le differenze sostanziali tra il *Tbm. lactis* e il *Tbm. helveticum* non esistono nella capacità di fermentare i singoli zuccheri e neppure nella qualità dell'acido lattico prodotto, ma soprattutto nella forma delle colonie ottenute in anaerobiosi, nella forma dei bastoncini provenienti dalle stesse, nella temperatura di sviluppo e nella produzione massima di acidità.

Ecco le caratteristiche delle due specie sopramenzionate:

Tbm. helveticum:

- a) colonie di struttura grossolanamente cristallina (nelle forme normali: p. 410 (*));
- b) bastoncini presentano un costante spessore di circa 1 micron di varia lunghezza e rinfrangono fortemente la luce (non sempre p. 411);
- c) nel latte magro sterile producono non meno del 2 % di acidità espressa in acido lattico (vi sono rare eccezioni p. 412);
- d) nel siero-peptone a 51° C. non si ha alcun sviluppo (in nessun caso p. 412);
- e) fermenta regolarmente destrosio, mannosio, galattosio, maltosio e destrina.

Tbm. lactis:

- a) le colonie sono di aspetto assai vario, ma nel caso tipico sono sottili a forma di lastra con struttura finemente cristallina o sabbiosa;
- b) al microscopio i microbi provenienti dalle colonie rifrangono poco la luce e presentano forma più o meno contorta a mò d'onda (non sempre p. 416);

(1) Burri e Kollmann: *loco cit.*

(*) Il n. indica la pagina del lavoro citato.

TABELLA

C.E.P.O. N.	Tempo di coagulazione a 40° C. - in ore	Sviluppo nel Siero-peptone a 51° C	Acidità nel latte magro (Gradi Thörner)	Acidità nel Siero-Peptone (Gradi Thörner)	Forme delle colonie in anaerobiosi (Wrigt-Burri)	Forme delle colonie superficiali in aerobiosi	Produzione di granuli
1	8	—	16.2	7.5	AA a	A	—
3	9	—	19.1	9.4	AA a	B	—
5	5	—	19.0	9.8	AA a	A	—
6	8	—	16.0	8,1	BB a	A	—
7	9	—	17.5	8.4	AA a	A	—
9	8	+	18.0	6.2	F	C	+
10	10	—	17.0	8.4	BB b	B	—
11	10	—	16.2	6.7	AA b	A	—
12	10	—	14.1	7.8	BB a	A	—
14	9	—	14.2	8.7	BB a	B	—
15	10	—	17.9	9.1	CC	—	—
16	10	+	18.0	6,4	FF	C	+
17	10	—	17.2	9.3	AA a	A	+
18	10	—	15.2	8.2	BB a	A	—
19	9	+	16.9	9.2	FF	C	+
20	10	—	16.2	7.2	BB a	B	—
21	9	—	15.5	9.4	AA a	A	—
31	9	+	14.1	7.6	AA c	F	+
40	10	+	18.8	8.8	AA c	F	+
41	10	+	14.8	7.8	AA c	F	+

O a. a. z. C	Tempo di coagulazione a 40° C. - in ore	Sviluppo nel Siero peptone a 51° C	Acidità nel latte magro (Gradi Thörner)	Acidità nel Siero Peptone (Gradi Thörner)	Forme delle colonie in anaerobiosi (Wright-Burri)	Forme delle colonie superficiali in aerobiosi	Produzione di granuli
42	10	+	19.8	9.3	AA c	E e F	+
32	7	—	32.0	11.8	AA a	F	—
33	8	—	32.6	11.3	AA a	F	—
34	8	—	28.0	10.2	AA b	F	—
35	7	—	37.1	11.8	BB b	F	—
36	8	—	29.8	12.1	AA a	A	—
37	8	—	31.2	12.5	AA a	B e E	—
62	7	—	31.3	11.0	DD	D	—
63	7	—	33.1	10.1	DD	A e D	—
45	9	+	16.4	7.9	AA b	A	+
46	8	+	17.6	12.1	AA a	A e E	+
47	9	+	13.8	7.5	AA b	A e E	+
48	9	+	13.2	7.6	AA b	A	+
49	9	+	13.5	7.1	AA b	A	+
50	9	+	16.9	9.8	AA a	A	+
52	8	+	12.8	7.8	AA a	A	+
53	9	+	14.2	7.3	AA c	A e E	+
54	9	+	17.1	9.1	AA a	A	+
55	9	+	15.4	7.7	AA c	A	+
56	8	+	14.7	7.4	AA c	A	+

- c) nel latte magro sterile a 38° C. l'acidità media prodotta espressa in acido-lattico oscilla attorno 1,5% e non raggiunge mai il 2% (p. 416);
- d) in siero-peptone a 51° C. si sviluppa ancora (non sempre p. 417);
- e) fermenta regolarmente: destrosio, mannosio, galattosio e lattosio; irregolarmente: levulosio, saccarosio, maltosio, destrina e salicina.

Leggendo attentamente il lavoro di Burri e Kollmann risulta che i sopraindicati caratteri non si trovano costantemente presso tutti i ceppi appartenenti al *Tbm. lactis* e *Tbm. helveticum* ad eccezione di due precisamente: il *Tbm. helveticum* non si sviluppa in nessun caso a 51° C. e il *Tbm. lactis* non arriva mai a produrre il 2% di acido lattico.

Volendo classificare i ceppi esaminati nel presente lavoro - secondo le indicazioni di Burri e Kollmann ed anche quelle di Orla Jensen - la questione non si presenta molto facile, inquantochè molti ceppi presentano caratteristiche talvolta proprie del *Tbm. lactis*, talvolta del *Tbm. helveticum*.

Prendendo come base la classificazione di Burri e Kollmann solo due sono caratteri assolutamente costanti, come già stato detto, presso i ceppi appartenenti al *Tbm. helveticum* e precisamente la mancanza dello sviluppo a 51° per quest'ultimo e la produzione dell'acidità in quantità inferiore al 2% per il primo; però anche questi da soli hanno un valore relativo, perchè la mancanza dello sviluppo a 51° C. non esclude l'appartenenza al *Tbm. lactis*, come anche la produzione dell'acidità inferiore al 2% al *Tbm. helveticum*. Perciò tenendo conto delle caratteristiche indicate per le suddette specie e cioè: forma delle colonie, forma dei microbi, capacità di fermentare gli zuccheri, ecc. si crede che non sia necessario che concordino tutte.

Tra i ceppi esaminati possono essere classificati senz'altro come *Tbm. lactis* i seguenti: 18, 9, 16, 19, 31, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52; 53, 54, 55, 56 inquantochè posseggono tutti i caratteri indicati dai suddetti AA.; eventualmente si dovrebbero escludere i ceppi 53-55-56 perchè incapaci di fermentare il galattosio.

Come *Tbm. helveticum* può essere classificato senza dubbio uno solo e precisamente il ceppo 35.

Come *Tbm. lactis* sono da escludersi senz'altro i ceppi 32, 33, 34, 36, 37, 62, 63: per la produzione di acido lattico che supera di parecchio il 2%; questo fatto e la mancanza dello sviluppo a 51° C. li fa assomigliare molto al *Tbm. helveticum*, pur mancando alcuni altri caratteri indicati da Burri e Kollmann.

Dei rimanenti 14 ceppi, tre e precisamente 10, 11, 12 potrebbero in certo qual modo classificarsi nella cerchia del *Tbm. helveticum* per la mancanza dello sviluppo a 51° C., per la forma delle colonie e dei bastoncini stessi, pur mancando la produzione di acidità superiore al 2%; mentre gli altri 11 e cioè 1, 3, 5, 6, 7, 14, 15, 17, 18, 20, 21, dovrebbero considerarsi piuttosto come forme vicine al *Tbm. lactis* perchè, pur non sviluppandosi a 51° C., l'acidità da loro prodotta è inferiore al 2% e le colonie, nonchè le forme microbiche, non presentano i caratteri di quelle del *Tbm. helveticum*.

Risulta dunque che di 40 ceppi esaminati, solo 16 posseggono tutte le caratteristiche necessarie per poter essere classificati - secondo Burri e Koll-

mann - come *Tbm. lactis* (15 ceppi) e come *Tbm. heiveticum* (1 ceppo). I rimanenti, pur possedendo la maggioranza dei caratteri di una delle suddette specie, non possono essere definiti con sicurezza come tali.

Più difficile diventa la classificazione - nel presente caso - seguendo le indicazioni di Orla Jensen (1) perchè, tra i caratteri principali, è da considerarsi - oltre alla capacità di fermentare gli zuccheri -, la qualità ottica di acido lattico. Ora quest'ultima non è stata determinata che per quattro ceppi per il fatto che i metodi sono piuttosto lunghi ed assai poco adatti quando si tratta di applicarli a parecchie decine di ceppi e perchè il valore diagnostico di queste caratteristiche fermentative, alquanto contrastato (v. pag. 15). Tenendo presente soprattutto la capacità di fermentare gli zuccheri e precisamente il maltosio ed il saccarosio, sei ceppi (31, 40, 41, 42, 47, 56) potrebbero classificarsi come *Tbm. lactis* o almeno molto simili ad esso e dieci ceppi (1, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 32, 33, 36) come *Tbm. helveticum*, perchè capaci di fermentare solamente il maltosio, ma non il saccarosio.

Però, volendo seguire con precisione le indicazioni di Orla Jensen, neppure i suddetti ceppi possono considerarsi senz'altro come *Tbm. helveticum* e *Tbm. lactis* perchè, per alcuni appartenenti al primo, manca la capacità di fermentare amido e destrina, e tutti i sei classificati come *Tbm. lactis* non fermentano affatto la salicina, oppure così debolmente da rendere questa capacità dubbia.

Il ceppo 9 dovrebbe essere addirittura escluso come ceppo del *Tbm. helveticum*, perchè produce acido lattico levogiro, mentre l'appartenenza al *Tbm. lactis* del ceppo 47 viene confermata anche dall'acido lattico levogiro da esso prodotto.

Se, infine, si dovesse prendere in considerazione la quantità di acido lattico prodotto a spese del maltosio e saccarosio, ben pochi ceppi rimarrebbero classificati come *Tbm. lactis* e *Tbm. helveticum* (vedi pag. 15).

Degli altri rimanenti 24 ceppi, 15 non fermentano nè saccarosio, nè maltosio e 9 solo saccarosio e non il maltosio. Dei primi 15, uno (il 19) può essere classificato come *Tbm. bulgaricum* per la produzione di acidità inferiore all'1,7% e per la presenza di granuli, 5 ceppi (34, 35, 37, 62, 63) come *Tbm. jugurt* per mancanza di granuli ed alta produzione di acidità. Inoltre il ceppo 34 produce acido lattico inattivo mentre gli altri 9 ceppi (3, 5, 6, 11, 12, 15, 18, 20, 21) non si possono considerare nè *Tbm. bulgaricum*, nè *Tbm. jugurt* per la mancata produzione di granuli e per la bassa percentuale di acido lattico prodotto.

A questo punto si rende necessario far presente che le culture pure di questi ceppi classificati come *Tbm. bulgaricum* e *Tbm. jugurt*, allestite in latte sterilizzato e pastorizzato, separatamente o in simbiosi con un ceppo dello *Str. thermophilus* isolato dello jogurt, non hanno mai dato luogo al caratteristico e gradevole sapore dello jogurt.

E' un fatto questo che non dovrebbe venir trascurato nelle classificazioni in quanto, nel caso specifico, più che la capacità di fermentare determinati idrati di carbonio o quella proteolitica, conta la produzione di sostanze aromatiche che, all'avviso dello scrivente, dovrebbero essere tenute nella massima considerazione, e perciò studiate a fondo, particolarmente

quando si tratta dei ceppi isolati dai lattici fermentati ai quali questi ceppi conferiscono le caratteristiche fondamentali.

Così, anche i rimanenti ceppi 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, non posseggono tali caratteri da poterli annoverare tra le specie di Orla Jensen; per la loro capacità di fermentare il saccarosio e non il maltosio, potrebbero eventualmente essere considerati assai vicini al *Tbm. bulgaricum*, dato che l'acidità prodotta alle spese del saccarosio è assai bassa e data la produzione di granuli nonchè la bassa quantità di acido lattico prodotto nel latte magro.

Ciò vale particolarmente per il ceppo 53, per il quale è stata trovata la produzione di acido lattico levogiro.

CONSIDERAZIONI FINALI

Forma delle colonie. — Diversi tipi di forme delle colonie, riscontrati dallo scrivente, non presentano sostanziali differenze da quelli descritti dagli A.A. che si occuparono dell'argomento.

Da quanto è stato esposto, risulta che le colonie superficiali nell'agar-siero-peptone presentano generalmente un aspetto diverso, secondo se il loro sviluppo ha luogo in aerobiosi od in anaerobiosi; solo per un piccolo gruppo di ceppi queste risultano quasi uguali.

Le differenze sostanziali consistono soprattutto nello spessore, talvolta nel diametro ed anche nella struttura nonchè nella conformazione del margine.

In anaerobiosi, le colonie sono sempre più spesse (perciò presentano la colorazione più decisa), più o meno lucenti e talvolta anche più larghe; inoltre non presentano mai la forma del cosiddetto « caput-medusae ».

Ciò è sostanzialmente confermato da Orla Jensen (1), il quale scrive che i termobatteri formano negli strisci strati assai sottili ed in qualche caso non crescono affatto. Il che non collima colle ricerche di Karnicki e Dorner (2), i quali hanno trovato i 5 tipi di colonie da loro descritti tanto in aerobiosi quanto in anaerobiosi; in più — per alcuni ceppi (particolarmente quelli classificati come *Tbm. lactis*) — le colonie ottenute in aerobiosi, risultano uguali a quelle sviluppatasi in anaerobiosi.

Le colonie, d'altra parte, non risultano caratteristiche per singole specie di termobatteri, il che concorda con i risultati ottenuti da Karnicki e Dorner. Sostanzialmente si può dire che i tipi di colonie riscontrati da questi A.A. rispondono pressochè a quelli trovati dallo scrivente, ad eccezione del tipo « FF » che essi non hanno descritto.

I ceppi classificati come *Tbm. lactis* o simili, seguendo la classificazione di Burri e Kollmann (3), danno luogo a colonie assai simili a quelle descritte dagli stessi A.A. per i suddetti ceppi, la descrizione delle quali, del resto, risponde in linea generale a quella riportata dello scrivente.

Inoltre, l'unico ceppo sicuramente classificato come *Tbm. helveticum* presenta il tipo di colonie caratteristiche descritte dagli A.A. sopra menzionati.

Per ciò che riguarda i ceppi non perfettamente identificabili come *Tbm.*

(1) Orla Jensen : *loco cit.*

(2) Karnicki e Dorner : *loco cit.*

(3) Burri e Kollmann : *loco cit.*

helveticum, ma assai vicini ad esso, solo tre (precisamente n. 10-11-34) presentano colonie caratteristiche di questo, mentre gli altri sette (n. 12-32-33-36-37-62-65) danno luogo a colonie di struttura finemente granulosa, tipiche del *Tbm. lactis*.

Orla Jensen (1) dà poche indicazioni nei riguardi delle forme delle colonie ed anche queste non collimano sempre con alcuni dati riscontrati dallo scrivente. Infatti, due dei tre ceppi (n. 9-47-53) che hanno prodotto acido lattico levogiro, hanno dato luogo alla formazione di colonie del tipo « caput medusae », mentre, secondo Orla Jensen, ciò non si verifica che eccezionalmente; d'altronde il ceppo n. 34, unico esaminato nei riguardi della produzione dell'acido lattico, acido che è risultato otticamente inattivo, non ha dato colonie del suddetto tipo, il che presenta un altro contrasto con le affermazioni dello stesso A.

Forme microbiche. — Le forme microbiche riscontrate dallo scrivente nel latte e sull'agar-siero-peptone, sembrano identiche a quelle descritte dagli altri A.A.

E' da notare però che, mentre la gran parte di questi non trova differenze per i singoli ceppi appartenenti a specie diverse, Burri e Kollmann affermano che il *Tbm. helveticum* si presenta sotto forme caratteristiche e ben diverse da quelle del *Tbm. lactis*. I risultati delle presenti ricerche concordano solo parzialmente con le suddette affermazioni; infatti, mentre è stato riscontrato che le forme dei ceppi classificati come *Tbm. lactis* (tanto seguendo le indicazioni di Burri e Kollmann quanto quelle di Orla Jensen) non presentano mai i caratteri descritti dai suddetti A.A. per il *Tbm. helveticum*, i ceppi classificati come quest'ultimo (secondo Orla Jensen) si presentano non di rado simili a forme che dovrebbero essere proprie del *Tbm. lactis* (precisamente i ceppi n. 10-16-32-33).

Seguendo invece la classificazione di Burri e Kollmann, l'unico ceppo classificato come *Tbm. helveticum*, presenta le forme caratteristiche indicate dai detti A.A.; d'altra parte la metà dei ceppi considerati come simili al *Tbm. helveticum*, non dà forme aventi i caratteri di quest'ultimo.

Per ciò che riguarda lo spessore e la formazione dei filamenti, i risultati del presente lavoro concordano, in linea generale, con le affermazioni della quasi totalità degli A.A.; esiste solo qualche contrasto con quanto scrive Orla Jensen. Secondo quest'ultimo A. lo spessore dei bastoncini è generalmente superiore ad un micron e nei filamenti si possono mettere sempre in evidenza i bastoncini facendo uso del balsamo di Canada, mentre lo scrivente ha trovato che lo spessore dei bastoncini è generalmente inferiore ad un micron e, nella maggior parte dei filamenti, non si possono distinguere i singoli segmenti.

Circa la metà dei ceppi esaminati presentava i granuli metacromatici o di volutina. Si è potuto constatare la presenza di questi anche dopo due anni di trapianti.

La produzione di acidità dai glucidi e dagli alcoli. — Da quanto è stato esposto in precedenza, risulta che la capacità di produrre gli acidi a

(1) Orla Jensen : *loco cit.*

spese dei glucidi ed alcoli, dovrebbe avere, per i bastoncini lattici, il valore decisivo nella determinazione della specie. Infatti l'Orla Jensen si appoggia in alcuni casi esclusivamente sui suddetti caratteri per stabilire le specie del *Thermobacterium*. A tale proposito afferma che bisogna seguire una tecnica ben determinata, perché altrimenti si corre il rischio di non poter mettere sempre in rilievo le capacità fermentative dei microbi verso determinate sostanze. Ciò riguarda in particolare modo i composti usati come fonte di azoto, non tanto per i composti stessi, quanto per i fattori di accrescimento che li accompagnano; inoltre la capacità fermentativa dovrebbe essere espressa determinando quantitativamente l'acidità prodotta.

Mentre il suddetto A. (1) muove serie e fondate obiezioni riguardanti l'uso del tornasole come indicatore, non fa alcuna critica al bleu di bromotimolo, bromocresolporpora ed al verde di bromocresolo, all'infuori dalla constatazione che, per determinare quantitativamente la produzione di acidità, bisogna ricorrere alla titolazione.

L'Orla Jensen, nell'attribuire ad un dato microrganismo la capacità di fermentare un determinato glucide od alcol, si basa sostanzialmente sulla quantità di acidità prodotta dal microrganismo in esame.

A questo procedimento si possono muovere serie obiezioni per infrimare il valore diagnostico della capacità fermentativa agli effetti della determinazione della specie; ciò principalmente per il fatto che alcuni bastoncini del genere *Thermobacterium* possono, in determinate circostanze, produrre quantità variabili di acido lattico a spese di determinati zuccheri ed, in alcuni casi, sino a perderne la capacità per poi acquistarla nuovamente. Particolarmente sono istruttive in merito le esperienze di Winnege e Henneberg riguardanti il comportamento di alcuni termobatteri verso il maltosio, (vedi pag. 13), esperienze con le quali è stato messo in evidenza come, alcuni ceppi classificati come *Tbm. bulgaricum*, acquistavano la capacità di fermentare più o meno fortemente il maltosio se coltivati, per un determinato periodo di tempo, nel latte tale e quale oppure aggiunto dello zucchero in parola.

Tenendo presente quanto sopra, si rimane perplessi quando, dopo aver constatato per es. che un bastoncino classificato da Orla Jensen come *Tbm. jugurt* (1) ha prodotto 0,9‰ di acidità a spese del maltosio, (che è proprio quello zucchero che, se fermentato o no, rappresenta la differenza sostanziale tra il *Tbm. jugurt* e *Tbm. helveticum*) si legge, nello stesso lavoro di Orla Jensen che il *Tbm. jugurt* non è in grado di acidificare il maltosio, Seguendo rigidamente le indicazioni di Orla Jensen diventerebbe assai ardua la classificazione dei ceppi isolati nel presente lavoro ed in quello di Karnicki e Dörner (2), per i quali l'acidità prodotta a spese del maltosio scende spessissimo sotto il 0,9‰, se si pensa che i ceppi in parola sono stati isolati dai formaggi a pasta cotta, ove risultano numerosi e dei quali

(1) Orla Jensen: nel «L.A.B. Ergänzungsband», 1943, pag. 5 e 6.

(2) Karnicki e Dörner: *loco cit.*

presentano la microflora caratteristica. Sarebbe perciò assai azzardato considerarli come *Tbm. jugurt* o *Tbm. bulgaricum*, germi caratteristici dello jugurt, dai quali si differenziano anche per il fatto che, se coltivati nel latte, non riescono mai a conferire a questo l'aroma caratteristico del suddetto latte fermentato.

Infine bisogna citare i lavori di Burri e Kollmann, i quali, per il forte numero di ceppi studiati, portano al riguardo un contributo di grande importanza. Come è stato esposto a pag. 16, tutti i ceppi isolati dai suddetti A.A. dal formaggio emmental o materiale che concorre alla sua fabbricazione (si tratta di qualche centinaio di ceppi studiati), acidificavano costantemente solo destrosio, mannosio, galattosio e lattosio, mentre il maltosio ed il saccarosio, cioè i glucidi sui quali si basa sostanzialmente la differenza tra il *Tbm. lactis* e il *Tbm. helveticum*, venivano spessissimo in-costantemente fermentati.

Per ciò che riguarda i ceppi studiati nel presente lavoro, pur non arrivando l'acidità da essi prodotta, a spese dei glucidi, alle cifre riscontrate da Orla Jensen, si nota generalmente, salvo pochi casi, che l'acidità prodotta a spese del levulosio, glucosio, mannosio e galattosio, risultava notevolmente più alta che non quando si trattava degli altri glucidi e alcoli, compresi ivi saccarosio e maltosio. Se si volesse perciò attenersi rigidamente a quanto venne esposto da Orla Jensen solo pochi ceppi, ad esempio n. 41 e n. 42, potrebbero essere considerati capaci di fermentare il maltosio ed il saccarosio; quale valore abbia ciò agli effetti della classificazione, è stato messo in evidenza nel cap. 5.

A tutto ciò bisogna aggiungere, assieme a Burri e Kollmann, che la determinazione della capacità di acidificare i glucidi ed alcoli non è certamente da considerarsi tra i mezzi semplici di identificazione. Considerato perciò che la suddetta proprietà non può essere presa senz'altro in considerazione, date le critiche mosse in merito, nè agli effetti di una classificazione che si ispira a criteri rigidamente scientifici, nè agli effetti di una classificazione che possa dare delle indicazioni di carattere pratico o applicativo, come per esempio la partecipazione dei singoli ceppi alla maturazione del formaggio e la loro utilizzazione nella preparazione delle culture da usarsi nella fabbricazione degli stessi, si domanda se vale la pena, salvo in casi particolari, di ricorrere alla ricerca in parola.

Il potere proteolitico. — I risultati delle presenti ricerche riguardanti la capacità di solubilizzare le sostanze proteiche da parte dei termobatteri, presenti nel siero-fermento e nel formaggio grana, concordano con quanto è stato trovato dagli altri A.A. per i bastoncini appartenenti allo stesso genere (vedi pag. 16). La capacità di solubilizzare la caseina, in un ambiente avente il pH pressochè uguale a quello del formaggio grana fresco, da parte dei termobatteri, che quasi sempre rappresentano, in sostanza, tutta la microflora del formaggio, assume un'importanza del tutto particolare. Infatti, permette di affermare, parallelamente con quanto viene oggi universalmente constatato per gli altri formaggi a pasta cotta, che la maturazione del grana si deve attribuire principalmente ai bastoncini lattici del genere *Thermobacterium* ed agli enzimi da essi prodotti.

CONCLUSIONI

- 1) Dall'esame di numerosi campioni del siero-fermento del formaggio grana è risultato che la microflora dello stesso è rappresentata, quasi sempre, sostanzialmente da bastoncini lattici del genere *Thermobacterium* Orla Jensen. Le forti quantità di siero-fermento che si usano aggiungere al latte in caldaia e le pratiche tecnologiche della fabbricazione del grana, fanno prendere ai suddetti batteri un'assoluta predominanza nel formaggio. Tenendo presente questo fatto sono state isolate, da una decina circa di campioni del siero-fermento, parecchie decine di ceppi dei bastoncini lattici appartenenti al genere suindicato, allo scopo di studiarne i caratteri morfologici e fisiologici.
- 2) E' stato constatato che, dal punto di vista morfologico, i bastoncini del genere *Thermobacterium* presentano un gruppo notevolmente omogeneo e non differiscono sostanzialmente dai termobatteri descritti da Orla Jensen ed altri A.A.

L'aspetto delle forme microbiche varia notevolmente con il variare del terreno nutritivo e talvolta anche con la anaerobiosi; quest'ultima si dimostra decisamente favorevole allo sviluppo delle colonie che si presentano più spesse ed in genere, anche più grosse.

- 3) Anche gli altri caratteri non presentano sostanziali differenze da quelli descritti da Orla Jensen ed altri A.A. per il genere *Thermobacterium*.

I bastoncini isolati non risultano sporigeni, non producono la catalasi, non riducono i nitrati in nitriti e producono, a spese dei glucidi ed alcoli, acido lattico e solo tracce di altre sostanze.

- 4) Per ciò che riguarda invece i caratteri delle singole specie descritte da Orla Jensen i risultati ottenuti nel presente lavoro dimostrano come alcune proprietà considerate dall'A. summenzionato come basilari per la classificazione, non possono essere prese sempre in considerazione nel senso da lui indicato.

Si tratta dell'acidificazione di alcuni glucidi ed in particolar modo del maltosio e glucosio. Il criterio qualitativo ed ancor più quantitativo sul quale si basa l'Orla Jensen nei riguardi della distinzione tra il *Tbm. lactis*, *Tbm. helveticum*, *Tbm. bulgaricum* e *Tbm. jugurt* non può essere preso in considerazione per i bastoncini isolati e descritti nel presente lavoro.

Infatti solo pochi ceppi potrebbero essere classificati come specie indicate da Orla Jensen, mentre nella maggior parte dovrebbero essere considerati come tipi intermedi o specie a sè stanti.

Assai più razionali e più semplici si sono dimostrate, agli effetti della classificazione, le indicazioni di Burri e Kollmann.

- 5) E' stato infine dimostrato, per la prima volta, che i bastoncini del genere *Thermobacterium* presenti nel siero-fermento del grana e nel grana stesso sono in grado di solubilizzare la caseina pressochè nelle stesse proporzioni e nelle stesse condizioni dei termobatteri descritti da altri A.A., termobatteri considerati quali componenti essenziali della microflora dei formaggi a pasta cotta. Il che permette di concludere che anche la maturazione del formaggio grana è dovuta sostanzialmente ai sopra-indicati bastoncini ed agli enzimi da essi secreti.

SUMMARY

This is the first part of a study undertaken by the A. on the bacterial content of the « grana » cheese (parmesan) which is considered the most important and characteristic of all classic Italian cheeses. In the manufacture of grana, today the so-called « siero fermento » (whey-ferment) used which is but the sour whey so manipulated as to obtain an almost pure culture of lactic acid bacteria, that reaches an average acidity of 1,1-1,3 % expressed in lactic acid.

The bacteria of a good « siero fermento » is generally represented almost exclusively by the genus *Thermobacterium* Orla Jensen, the number of which almost always overreaches the milliard a cc.

Therefore the A. thought that it was fitting to study the thermobacteria of the « siero fermento » in detail, following the methods indicated by Orla Jensen and by Burri and Kollmann.

From the results of these researches the difficulty and sometimes the impossibility of classifying single strains among the species described by Orla Jensen appears inasmuch as every one of them presents characters that are common to two or more of them.

Besides the A. puts in evidence that the power of splitting up casein of thermobacteria is such a one that they may be considered as being the main factors of the maturation of grana cheese.

(Pervenuto in redazione il 5-2-47).