

ANNALI
DI
MICROBIOLOGIA

RACCOLTA DI MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA
ALL'AGRICOLTURA, ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI

A CURA DEI PROFESSORI:

T. CASTELLI PERUGIA - V. PEGLION BOLOGNA - B. PEYRONEL TORINO
S. RICCARDO NAPOLI - M. SACCHETTI BOLOGNA - O. VERONA FIRENZE

DIRETTA DA
C. ARNAUDI MILANO

OTTOBRE 1940 - XVIII
VOL. I - FASC. II

ORGANO DELLA STAZIONE SPERIMENTALE
DI BATTERIOLOGIA AGRARIA DI CREMA

DIREZIONE ED AMMINISTRAZIONE: MILANO VIA CELORIA 2

NORME DI COLLABORAZIONE

Si accettano memorie originali italiane e straniere, purchè scritte in caratteri latini e dattilografate. Esse devono essere perfettamente corrette anche nella punteggiatura.

In ottemperanza alle disposizioni del Consiglio Nazionale delle Ricerche ogni articolo deve essere corredato da un breve riassunto (non più di dieci linee) in italiano. Lo stesso deve essere pure riportato in inglese o tedesco. Se l'Autore non ne fa l'invio in una delle due lingue verrà provveduto d'ufficio alla traduzione e la spesa relativa verrà addebitata ai signori autori.

Agli Autori dei lavori originali vengono concesse non più di 16 pagine di stampa; il numero di pagine in più sarà a carico dell'Autore al puro costo di stampa. Le modificazioni tipografiche che non siano semplici correzioni di errori di composizione saranno addebitate agli Autori a prezzo di costo.

I clichés, le tabelle e le tavole fuori testo sono a carico degli Autori.

Per ogni lavoro verranno concessi 50 estratti gratuiti; per un maggior numero gli Autori dovranno accordarsi direttamente con la Tipografia.

Per la bibliografia si prega si attenersi alle seguenti norme:

a) La bibliografia, col relativo numero di riferimento, deve essere scritta alla fine del lavoro; b) I numeri di riferimento bibliografico nel testo devono essere scritti tra parentesi; c) Le citazioni devono essere fatte nel seguente ordine: 1° Nome dell'Autore; 2° Titolo del lavoro; 3° Titolo del giornale abbreviato; 4° Anno; 5° Volume (in numero arabo, sottolineato); 6° N° delle pagine.

Il numero di chiamata nel testo di eventuali note a piè di pagina deve essere scritto in alto piccolo e con una parentesi di chiusura.

Per i numeri decimali adoperare virgole e mai punti, così nel testo come nelle tabelle.

Adoperare sempre le seguenti abbreviazioni:

Chilogrammo = Kg	metro = m	centim quadr = cmq	minuto se- condo = sec
ettogrammo = hg	decimetro = dm	millim quadr = mmq	
grammo = g	centimetro = cm		per cento = %
decigrammo = dg	millimetro = mm		per mille = ‰
centigrammo = cg	micron = μ	litro = l	normale = N
		centimet.cubo = cc	
milligrammo = mg		ora = h	decimo norm = O, I N
millesimo di			
grammo = y	metro quadr = mq	minuto primo = min	
	ph, Ph ecc = pH		

(tutti questi segni sempre senza punto)

Le formule chimiche devono essere scritte con gli indici in basso. Es. CaCl₂.

S O M M A R I O

S. RICCARDO - Sulle variazioni quantitative dei microrganismi del terreno coi vari metodi di conta	pag. 49
I. POLITI - Ricerche sui fermenti lattici .	» 65
E. CORBERI - Osservazioni sulle variazioni della microflora del latte della prov. di Milano .	» 85
C. ARNAUDI - Alcuni aspetti della vita microbica del terreno	» 97

Prezzo di Abbonamento per ogni volume (costituito di 6 fascicoli)
ITALIA L. 50- ESTERO L. 100- UN FASCICOLO SEPARATO L. 10

Sulle variazioni quantitative dei microrganismi del terreno coi vari metodi di conta

(Necessità di una intesa per la unificazione dei metodi per lo studio della carica batterica nel suolo agrario).

Prof. Salvatore Riccardo

(Ricevuto il 16 Settembre 1940-XVIII)

È noto come l'esame microscopico del suolo non abbia mai corrisposto a quello colturale, nel senso che la coltura batteriologica rivelava per il passato un numero di microrganismi immensamente superiore a quello che l'esame microscopico dava a conoscere.

La ragione di simile constatazione è stata trovata circa venti anni or sono da Conn (1), il quale ha fatto vedere che i microbi del suolo preferiscono i colori acidi d'anilina ai colori basici che siamo soliti usare per tutti gli altri campi della batteriologia.

Questi fatti furono in seguito riconfermati da Winogradsky, da Rossi e da altri, e portarono alla conclusione che le vecchie analisi del numero dei microrganismi del suolo avevano perduto molto valore, ed occorreva pertanto sostituire nuove misure per ottenere dati più rispondenti al vero.

Questo per quanto riguarda il numero dei microrganismi; passando alla loro qualità, il fatto è più sconcertante, in quanto che le colture batteriche non possono essere altro che elettive, e rappresentano quindi un numero ristretto di specie.

Fondando gli studi della microbiologia agraria sopra un nuovo indirizzo, basato sull'esame diretto del suolo, si è constatato come le osservazioni microscopiche mettano in evidenza quasi costantemente delle forme che predominano rispetto alle altre (rappresentate quest'ultime da eumiceti, streptotricce, colonie batteriche, e da protozoi), chiamate dal Rossi «ammassi schizomicetici glomerulari» o semplicemente «glomeruli», i quali sarebbero capaci di caratterizzare il terreno in cui questi si trovano, e costituirebbero le apparenze più frequenti dello schizomicete nel suolo.

Il metodo di conta della maggior parte degli schizomiceti vivi in un ambiente qualsiasi è, come si sa, quello di Koch, delle piastre disseminate in gelatina ed in agar comune, ovvero altrimenti preparate. Ma, in quanto ai risultati che si ottengono, abbiamo già messo in evidenza (2) i difetti di tale metodo, specie se le diluizioni del materiale da usare vanno spinte oltre ad 1:10.000.000 perchè in tal caso possono aversi cifre inattendibili perchè troppo varie.

Senza contare che le cifre minime di colonie possono essere errate e alterate da semplice inevitabile inquinamento. Facendo qualche confronto col metodo diretto di conteggio, abbiamo scritto quanto segue: «Trattandosi di terreno, non si poteva che usare il metodo Rossi di conta dei *glomeruli* (3). Per cui uno stesso campione di suolo veniva adoperato per la conta a mezzo delle piastre disseminate e per la conta dei *glomeruli* per grammo. I risultati furono molto favorevoli nelle due determinazioni (233.736 e 253.028) che si presterebbero anche ad una media generale (243.382) di quattro determinazioni. Il che porterebbe ad una media di 2.433.820 di germi (calcolando che ad ogni *glomerulo* si debba riconoscere il valore di 10 germi) o di 24.338.200 se si volesse portare tale valore a 100. Ma bastano queste cifre per dire che se tali cifre coincidono con cifre di *qualcheduna* delle scatole, sono troppo lontane da altre per non ammettere, nel meccanismo delle diluizioni, i fenomeni di selezione di specie o di individui o dell'una e dell'altra».

E così concludevamo:

«Però è da notarsi che in realtà ad un dato momento i due metodi coincidono o quasi. E questo è buon augurio perchè nuove e pazienti ricerche, facendoci conoscere quale sia la diluizione che più corrisponda al vero, ed ammettendo che la conta diretta dei *glomeruli* del terreno corrisponda a tutto quanto si può vedere nel terreno in fatto di schizomiceti, possano conservare al metodo introdotto nella scienza da Roberto Koch, se non tutta, almeno una parte del credito e della creduta utilità che ha avuto fin qui ».

Le esperienze, di cui si dà conto in questo contributo, eseguite con vari campioni di terreno, vogliono collaudare ancora una volta il valore sperimentale della conta degli schizomiceti terricoli in piastre in confronto colla conta diretta microscopica dei cosiddetti « ammassi schizomicetici *glomerulari* » o « *glomeruli* ».

Per la conta dei « *glomeruli* » abbiamo preso in considerazione 100 campi microscopici, rilevati quest'ultimi in due conte di 50 campi ognuna.

Come substrati per lo sviluppo delle colonie, oltre al comune agar-brodo di carne, si è adoperato l'agar all'albuminato di sodio di Waksman ¹⁾ e l'agar all'estratto di terra ²⁾.

La reazione dei substrati veniva corretta a pH = 6,8, e la temperatura di incubazione delle piastre era di 28° C.

I campioni di terra da esaminare venivano prelevati da vari punti del Parco Gussone, il cui terreno costituisce una estesa zona di bosco piantato

¹⁾ Acqua distillata gr. 1000; glucosio gr. 1; K₂ HPO₄ gr. 0,5; MgSO₄ · 7H₂O gr. 0,2; Fe₂ (SO₄)₃ tracce; albume d'uovo sciolto in 0,1 N di Na OH fino a rendere alcalina la fenolfaleina gr. 0,25; agar gr. 15.

²⁾ Un Chilogr. di buon terreno da orto si mescola con un litro di acqua di conduttura, e si pone in autoclave per 30 minuti a 120° C. Il liquido torbido viene filtrato, dopo aggiunta di un po' di talco, attraverso un doppio filtro di carta a pieghe, ottenendo così circa 800 cc. di filtrato. Per preparare un litro di substrato, a 100 cc. di questo filtrato si aggiungono 900 cc. di acqua distillata, gr. 0,5 di K₂ HPO₄ e 15 gr. di agar.

sulla lava del 1631, risultante da detriti di scorie e da ceneri lanciate nelle varie conflagrazioni vesuviane. A questi ingredienti minerali trovasi mescolato il terriccio proveniente dal cumulo dei residui appartenenti ai vegetali, che vivono sulla superficie della lava.

La tabella seguente dà la composizione chimica del terreno che ricopre la lava.

100 gr. di terra fine seccata all'aria contengono materie:				
	Solubili in ac. acetico al 10 %	Solubili in HCl bollente (d. 1,12)	Non attacc. dagli acidi	Somma comple- siva
Anidride silicica	0,182	0,040	37,012	37,234
» fosforica	—	0,508	—	0,508
Ossido di ferro e d'alluminio	0,113	15,929	8,432	24,474
» » calcio	0,638	1,062	5,213	6,913
» » magnesio	tracce	0,054	0,288	0,342
» » potassio	0,090	4,104	0,550	4,744
» » sodio	0,102	0,883	0,719	1,704
Anidride carbonica sciolta	0,257	—	—	0,257
Acqua igroscopica	—	—	—	9,387
Perdita a fuoco	—	—	—	4,073
Materia umica	—	—	—	9,376
				99,012

Questa analisi (4) si riferisce al terreno della parte boschiva del Parco, costituita essenzialmente da *Quercus ilex L.* e da piante spontanee.

Ma alcuni appezzamenti del Parco sono stati da molti anni trasformati in campetti sperimentali orto-frutticoli, e quindi il terreno ha subito delle notevoli modificazioni in seguito a laute concimazioni.

I vari prelevamenti del terreno venivano fatti precisamente nelle seguenti località del Parco Gussone: in un campicello coltivato da vari anni ad ortaggi e fiori; in punti non coltivati e dove dominavano leguminose e graminacee spontanee, ovvero in punti difficilmente calcati da piede umano; altri prelevamenti, infine, venivano eseguiti nell'Orto botanico della Facoltà di Agraria, facente parte, anch'esso, del Parco Gussone.

La presa dei campioni veniva fatta ad una profondità di circa 10 cm., smuovendo il terreno mediante la lama di un grosso coltello che che si arroventava alla fiamma di una lampada ad alcool sul posto, e prelevando poscia il campione con un cucchiaino sterilizzato anch'esso alla fiamma, da un punto della parte verticale dello scavo. La terra si poneva, quindi, con le dovute precauzioni antisettiche, in pesa-filtri sterili.

Nelle tabelle I-VI vengono riportati i risultati ottenuti col metodo delle piastre e con quello della conta diretta al microscopio degli « ammassi schizomicetici glomerulari ».

TABELLA I

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	15-V-940	1 : 10.000	28° C.	33.492.000	Terreno del Parco Gussone, coltivato da vari anni ad ortaggi e fiori.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	2.501.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	1.529.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0006	3,24	50	31 ⁽¹⁾	1224	5400	6.609.600	(1) di cui 1 in ognuno di 19 campi e 2 in ognuno di 6 campi.
2	0,0004	3,24	50	22 ⁽²⁾	897	8100	7.265.700	(2) di cui 1 in ognuno di 12 campi e 2 in ognuno di 5 campi.

ALCUNE CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI CHE SI OTTENGONO COL METODO DELLE PIASTRE DISSEMINATE, E BREVE RASSEGNA CRITICA SUI PIU' RECENTI METODI DI CONTA DEI MICRORGANISMI TERRICOLI.

Esaminando i dati delle tabelle I-VI, limitati alle sole piastre, appare subito evidente la differenza dei risultati avuti, per lo stesso terreno, modificando il solo substrato nutritivo. L'agar-brodo di carne ha dato sempre cifre più alte, rispetto all'agar-albuminato di sodio di Waksman e all'agar-estratto di terra. Di questi due ultimi substrati, se si eccettuino le sole tabelle V e VI, le cui cifre sono pressochè uguali, l'agar all'albuminato di sodio di Waksman ha dato, a parità di condizioni, cifre un po' più elevate dell'agar all'estratto di terra.

Se si confrontano, poi, le cifre delle piastre con quelle ottenute mediante la conta diretta al microscopio degli « ammassi schizomicetici glomerulari » le differenze sono minime (eccettuata la sola tab. IV i cui dati sono alquanto

TABELLA II

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluzione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	15-V-940	1 : 10.000	28° C.	63.724.000	Terreno del Parco Gussone coltivato da varî anni ad ortaggi e fiori.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	10.032.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	3.405.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0006	3,24	50	26 ⁽¹⁾	1061	5400	5.729,400	(1) di cui 1 in ognuno di 13 campi, 2 in ognuno di 4 campi, 5 in 1 campo.
2	0,0006	3,24	50	18 ⁽²⁾	734	5400	3.963,600	(2) di cui 1 in ognuno di 14 campi e 2 in ognuno di 2 campi.

discordi), considerando, bene inteso, i soli substrati nutritivi all'albuminato di sodio e all'estratto di terra.

Le cifre delle tabelle I-VI, ottenute adoperando la diluizione 1 : 10.000, avrebbero certamente subito delle modificazioni, anche molto sensibili, se si fosse adoperata una diluizione molto alta, per le ragioni esposte altrove (2).

Ma se i due metodi di conta ad un dato momento coincidono o quasi, anche se ciò è buon augurio per perseverare in nuove e pazienti ricerche non vogliamo escludere di prendere in seria considerazione quanto altri Autori hanno fatto per migliorare i metodi di studio della carica batterica nel terreno, sia escogitando nuovi metodi di conta diretta al microscopio, sia adoperando substrati nutritivi più appropriati di quelli finora in uso.

Questo per quanto riguarda — come si è detto — la carica microbica in genere (batteri, actinomiceti ed eumiceti), non volendo qui occuparci dei microbi specifici (anabolici e catabolici), di alcuni processi fondamentali del terreno agrario, il cui numero e la cui attività vengono studiati con appositi accorgimenti e substrati nutritivi.

TABELLA III

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	12-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	24.693.000	Terreno del Parco Gussone non coltivato; sviluppo spontaneo di leguminose e graminacee.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	2.592.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	1.442.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0016	3,24	50	7 ⁽¹⁾	714	2025	1.445,850	(1) 1 in ognuno di 7 campi.
2	0,0010	3,24	50	6 ⁽²⁾	612	3240	1.982,880	(2) 1 in ognuno di 6 campi.

Dopo che Conn (5) ci fece conoscere la tecnica basata sull'uso dei colori del gruppo eosinico (floxina, eritrosina, rosa bengala) per lo studio dei batteri del suolo, furono le tre memorie di Winogradsky (6-8), comparse a breve intervallo di tempo l'una dall'altra, che fecero soprattutto attirare l'attenzione sulla cosiddetta *microscopia microbiologica del terreno*.

I punti salienti della tecnica raccomandata da Conn erano i seguenti:

Soluzione fissante di gelatina. — Sciogliere a blando calore gr. 0,15 di gelatina in 1 litro di acqua distillata, distribuire in tubi da saggio (5 cc. per tubo) e sterilizzare all'autoclave.

Soluzione colorante. — Sciogliere gr. 1 di eritrosina o rosa bengala in 100 cc. di una soluzione al 0,5% di fenolo, contenente da 0,01 a 0,10 di Ca Cl₂. La quantità precisa di Ca Cl₂ dev'essere determinata sia per il colore da usare che per il terreno da tingere ¹⁾.

¹⁾ Conn consiglia di aggiungere alla soluzione colorante, oltre al fenolo, una piccolissima quantità di un sale di calcio, che ha lo scopo di convertire il colore (acquistato in forma di sale disodico) in sale di calcio, il quale è molto meno solubile del sale disodico.

TABELLA IV

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	12-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	57.523.000	Terreno dell'Orto botanico della Facoltà di Agraria.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	12.117.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	8.950.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0026	3,24	50	6(1)	612	1246	762.552	(1) 1 in ognuno di 6 campi.
2	0,0013	3,24	50	1	102	2492	254.184	

Modo di procedere. — Mettere gr. 0,5 di terreno in 5 cc. della soluzione di gelatina. Mescolare ben bene, versare il contenuto di una grande ansa sopra un vetrino portaoggetti, occupando l'area di circa un cm². Essiccare sopra un bagno-maria bollente, colorare per un minuto, lavare con acqua, asciugare ed osservare al microscopio con forte ingrandimento.

Winogradsky modificò sensibilmente la tecnica di Conn, preparando apposite sospensioni di terreno e introducendo *l'anse jaugée*, di noto volume, per conoscere la quantità dei microrganismi ivi contenuti, mentre Koffman (9), tre anni dopo, descriveva un altro metodo, cosiddetto « capillare », col quale può eseguirsi anche il conteggio dei batteri, in preparati fissati e colorati. Si determina dapprima il coefficiente (che, per la diluizione 1:10 e cc. 0,1 sotto il coprioggetti, è uguale a 100) e quindi il rapporto tra superficie del coprioggetti (delle dimensioni di mm. 40 x 24) e campo visuale.

Così, con obiettivo di 1/12 imm. ed oculare 5 (ingr. di circa 1360), si avrebbe una superficie del campo visuale di mmq. 0,0188596, ed il rapporto

delle due superfici sarebbe $\frac{960}{0,0188596} = 50.902$, ossia in cifra tonda 50.900.

TABELLA V

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	22-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	19.917.000	Terreno del Parco Gussone; flora spontanea, e punto difficilmente calcato da piede umano.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	5.680.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	5.066.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0014	3,24	50	10 ⁽¹⁾	1020	2314	2.360.280	(1) 1 in ognuno di 10 campi.
2	0,0008	3,24	50	12 ⁽¹⁾	1224	4050	4.957.200	(2) 1 in ognuno di 6 campi, e 3 in ognuno di 2 campi.

L'esame vien fatto ad una serie di campi visuali, sommando le cifre dei microrganismi trovati, moltiplicando per 50.900, e dividendo infine il prodotto per il numero dei relativi campi visuali.

In ultimo, per calcolare il numero dei batteri contenuti in gr. 1 del campione di terra, si moltiplica la cifra ottenuta per il coefficiente.

Löhnis (10) critica il metodo di Winogradsky, e non esita a dire che « i risultati ottenibili non giustificano in nessun modo l'occorrente impiego di tempo e di lavoro ». Con siffatto metodo, secondo l'A., non viene determinato il solo numero degli organismi viventi, ma anche delle cellule morte sia batteriche che fungine, che possono conservarsi a lungo, specie in terreni acidi, ricchi di *humus*.

Ai rilievi critici di Löhnis si può rispondere che, secondo Rossi (11) ed altri Autori, i batteri che si vedono nel terreno coi metodi di Conn e di Winogradsky sono tutti *vivi*, perchè appena morti dovrebbero decomporsi e sparire. In ogni modo, la colorazione di microrganismi in via di decomposizione non potrebbe riuscire mai perfetta, come tutta la pratica batteriologica ci ha insegnato fin qui.

TABELLA VI

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	22-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	6.349.000	Terreno del Parco Gussone, flora spontanea, e punto difficilmente calcato da piede umano.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	1.378.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	1.093.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0010	3,24	50	9 ⁽¹⁾	918	3240	2.974.320	(1) di cui 1 in ognuno di 7 campi e 2 in 1 campo.
1	0,0006	3,24	50	9 ⁽²⁾	918	5400	4.957.200	(2) Idem.

Nel *III Congresso Internazionale della Scienza del suolo*, tenutosi ad Oxford dal 30 luglio al 7 agosto 1935 sotto la presidenza di Russell, Direttore della Stazione Sperimentale di Rothamsted, Thornton insisteva sull'argomento delle fluttuazioni numeriche degli schizomiceti nel terreno. Thornton, nel fare la conta ogni due ore, adoperando il metodo classico delle piastre e, parallelamente, la numerazione diretta al microscopio, otteneva numeri dell'ordine di qualche decina fino a 80 milioni, colle piastre, mentre con la conta diretta dava cifre che potevano raggiungere vari miliardi.

Per eliminare le cause dovute, da una parte, alla dispersione assai ineguale dei germi e, dall'altra, alla difficoltà di determinare esattamente il peso così piccolo della porzione di terra che essi popolano, Thornton, in collaborazione con Gray (12) ebbe l'idea di sospendere le particelle di terra non nell'acqua pura, ma in una sospensione di polvere d'indaco, le cui particelle sono facilmente riconoscibili e numerabili al microscopio. Partendo da questa doppia sospensione si preparano i vetrini: si contano, così, in parecchi campi microscopici i batteri colorati con l'eritrosina fenicata e le particelle d'indaco, determinando infine il rapporto fra le due cifre. Essendo noto il numero di

particelle del colorante in un grammo di terra, è facile calcolare la frazione corrispondente al vetrino.

Le prove hanno dimostrato che l'errore del metodo non oltrepassa il 3,30% e che non dipende da chi esegue la conta; le prove dell'A. hanno ancora dimostrato che, aggiungendo sospensioni batteriche di densità nota ad un terreno sterile, si ritrovano gli stessi numeri con un errore di circa il 3,5%. Dalle numerazioni eseguite con questo nuovo metodo, i campi di Rothamsted avrebbero una densità batterica da 1 a 4 miliardi per grammo di terra. Il rapporto fra la « conta totale » e la « conta con le piastre » raggiunge nei comuni terreni delle cifre che superano 120, mentre, per il terreno coltivato ad essenze prative, questo rapporto si eleva fino ad un massimo di 1780.

Truffaut e Lefouin (13) che hanno effettuato la conta batterica col metodo di Thornton e Gray hanno ottenuto in terreni coltivati a frumento perfino tre miliardi e 800 mila germi per grammo.

Tralasciamo i calcoli matematici di Hwang (14), e passiamo alle più recenti modifiche apportate ai substrati nutritivi da servire per l'allestimento delle piastre.

Gli schizomiceti nei terreni normali sono rappresentati, secondo Conn, per circa il 5-10% da bacilli sporigeni del tipo *Bac. subtilis*, per circa il 10% da bacilli mobili non sporigeni rapidamente liquefacenti (appartenenti soprattutto al tipo *Pseudom. fluorescens*), per il 40-75% da bacilli o cocci non sporigeni che non liquefanno la gelatina o la liquefanno con estrema lentezza, e per il 12-50% da actinomiceti (15). A questi bisognerà aggiungere gli eumiceti, e quindi non è chi non veda la difficoltà di scegliere un substrato nutritivo che risponda bene alle esigenze nutritive della grande maggioranza della microflora terricola.

Fra gli Autori che hanno portato un notevole contributo, tendente a modificare i metodi in uso per lo studio della carica microbica del suolo, un posto preminente spetta a Waksman (16-19).

In una riunione della *Società dei batteriologi americani*, un gruppo di microbiologi agrari pose in discussione il problema dei substrati nutritivi da usarsi nella batteriologia del suolo. Una commissione, composta da Waksman, della New Jersey Agricultural Experiment Station, e da Fred, dell'Università di Wisconsin, propose, com'è noto, i seguenti substrati:

Per i batteri: *agar all'albuminato di sodio; agar al caseinato di sodio; agar e gelatina all'estratto di terra*. Per la composizione chimica del primo substrato si veda a pag. 50; per gli altri terreni rimandiamo alle memorie originali. Reazione: pH = 6,8.

Per gli eumiceti: *terreno acido sintetico*: acqua dist. gr. 1000; glucosio gr. 10; peptone gr. 5; solfato di magnesio gr. 1; agar gr. 25; reazione corretta a pH = 4,0.

Sulla temperatura di incubazione e sul periodo di permanenza delle piastre in termostato, la stessa commissione propose una temperatura di 28°-30° C. (eccetto, bene inteso, per la gelatina), e una permanenza di 8-10

giorni per i batteri, di 14 giorni per gli actinomiceti, e di 2-3 giorni per gli eumiceti.

È ovvio che la diluizione del terreno deve essere modificata, a seconda che si tratti di batteri ed actinomiceti, da una parte, e di eumiceti dall'altra. Per la conta di questi ultimi in mezzi acidi, nei quali viene inibito lo sviluppo dei batteri, il grado di diluizione dev'essere relativamente basso.

Il contenuto microbico degli strati superficiali del suolo è stato studiato da Pagliani, Maggiore e Frattini col metodo delle culture su piastre di gelatina di carne, nelle quali le numerazioni venivano eseguite al termine del terzo giorno (20).

In quanto ad altri substrati, possiamo ricordare l'*agar al decotto di torba* (Perotti) l'*agar sintetico* di Lipman e Brown, l'*agar all'albumina* di Brown, l'*agar al peptone* di Temple, la *gelatina al decotto di terra* e l'*agar-asparagina* di Conn; l'*agar e la gelatina al decotto di terra* di Löhnis, l'*agar al decotto di terra* di Fischer, l'*agar-fagioli*, ecc.

Castelli (21), adoperando in alcune esperienze agar al decotto di terra, agar-albumina, gelatina-albumina, agar-carne e gelatina-carne, ha avuto cifre più elevate con la gelatina di carne.

Verona (22-23) adopera l'agar-fagioli, tenendo le piastre da 10 a 15 giorni a 24°-25° C.

Topping (24-25) ha adoperato i seguenti substrati: agar-brodo diluito-mannite, agar-peptone-estratto di lievito, gelatina-acqua di condotta, agar-caseina-glucosio, agar-asparagina-mannite, agar-estratto di terra.

Julius (26) sostituisce le scatole Petri con flaconcini. Si versa in ciascun flaconcino dell'agar liquefatto, contenente da 1 a 5 gocce del liquido da esaminare, e, mediante apposito apparecchio, si comunica un movimento rotatorio rapidissimo (800-1000 giri al minuto); in tal modo l'agar si solidifica sulle pareti del vetro in strato sottile e perfettamente uniforme, che permette, dopo il periodo di permanenza in termostato, una conta facile delle colonie. Secondo l'A., con l'aiuto di un dispositivo che permetta una rotazione lenta a spirale del flaconcino, si possono arrivare a contare senza fatica fino ad 8.000 colonie, ciò che sarebbe assolutamente impossibile colla tecnica abituale delle scatole Petri.

CONCLUSIONI

I risultati avuti in queste e in molte altre esperienze non fanno che confermare ancora una volta la necessità di trovare un metodo che offra il minimo di errori possibile nella valutazione della carica microbica del terreno agrario.

I risultati contraddittori che si ottengono sono dovuti anzitutto all'incertezza dei metodi stessi, anche fondamentali, per cui, cambiando metodo, cambiano più che sensibilmente i risultati; ma sono dovuti, ancora, all'antagonismo che numero e qualità di microrganismi possono, durante lo sviluppo sulle piastre, esercitare fra di loro. E questo antagonismo è soprattutto accentuato fra actinomiceti e batteri nelle culture di laboratorio (27-31).

E ciò senza contare le giuste osservazioni del Collega Arnaudi (32) là dove dice che «la quantità di schizomiceti che possiamo trovare nel terreno

fertile impiegando metodi adatti al rilevamento, è molto maggiore di quanto non si credesse un tempo. Si tratta talvolta di centinaia ed anche migliaia di milioni di microrganismi per grammo di terra secca. Tale ingente numero di germi è soltanto in piccola parte reperibile nei liquidi circolanti nel terreno; è il complesso solido che alberga i microrganismi, li trattiene e in certa guisa li assorbe. Conseguenza da ciò la estrema influenza che sulla vita dei microrganismi è esercitata dalla struttura fisico-meccanica del terreno ».

Consegue, pertanto, l'enorme importanza che acquista, per la buona riuscita delle piastre disseminate, l'operazione di agitare bene la prima sospensione del terreno in acqua sterile, onde separare la maggior quantità possibile di batteri dalle particelle solide. L'importanza di tale operazione fa dichiarare, addirittura, a Whittles (33) che adoperando un apposito apparecchio scuotitore, con un certo numero di vibrazioni per minuto, si possono ottenere col metodo delle piastre dei numeri molto prossimi a quelli che si hanno coll'esame diretto microscopico.

Da quanto sopra appare chiaro che:

1) Il solo metodo delle piastre disseminate per la valutazione della carica batterica del terreno agrario non può dare che un giudizio molto vago, che può assumere un certo significato soltanto quando il numero dei microrganismi è molto scarso.

2) I dati numerici ottenuti col metodo delle piastre dovrebbero essere confrontati con quelli che si hanno con uno dei metodi diretti microscopici fra quelli citati e di più facile impiego.

3) Il terreno da esaminare non dovrebbe essere seccato prima di allestire le piastre, perchè il prosciugamento spesso determina diminuzione del numero dei microbi. Siamo, pertanto, di accordo con coloro che consigliano di *preparare un campione perfettamente omogeneo, mescolando numerosi piccoli saggi prelevati in punti diversi del terreno da esaminare, e col loro normale contenuto d'acqua.*

4) Il terreno dovrebbe essere agitato uniformemente per dieci minuti nel preparare la prima diluizione in acqua sterile.

5) In quanto ai substrati nutritivi, siamo d'accordo col Waksman per quanto riguarda la preparazione di due terreni, uno a reazione pressocchè neutra (pH = 6,8) per batteri ed actinomiceti, e l'altro a reazione acida (pH = 4,0) per gli eumiceti. Ciò valga anche per il diverso grado di diluizione.

Riguardo, poi, alla scelta dei vari terreni nutritivi per l'allestimento delle piastre, se si approva il concetto di eseguire parallelamente la conta diretta al microscopio dei batteri e quindi farne la media, non v'è più ragione di essere molto severi, come il Waksman, là dove dice che « un substrato tipico dovrebbe essere impiegato, che non contenesse peptone, estratto di carne, estratto di terreno, o materiale analogo, che ne farebbe variare molto la composizione ».

6) Per ogni campione di terreno dovrebbero essere impiegate almeno 9 piastre, e il loro periodo di incubazione a 28° C. dovrebbe essere di sette giorni al minimo.

RIASSUNTO

Dopo di aver riportato alcuni risultati sulla carica batterica di vari campioni di terreno, ottenuti col metodo delle piastre disseminate e, parallelamente, colla conta diretta al microscopio di ammassi schizomicetici, l'A. fa alcune osservazioni sulla incertezza di tali risultati qualora si adoperi il solo classico metodo delle piastre. Le variazioni numeriche tendono, poi, ad accentuarsi modificando substrati nutritivi e grado di diluizione, senza contare l'antagonismo che numero e qualità di microrganismi possono, durante lo sviluppo nelle piastre, esercitare fra di loro.

L'A. auspica, pertanto, un'intesa fra i microbiologi agrari onde unificare i metodi per lo studio della carica batterica nel suolo agrario. Fra le proposte formulate, si consiglia di fare una media fra i dati ottenuti col metodo delle piastre e quelli ottenuti colla conta diretta al microscopio.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Anführung einiger Resultate betreffend die Bakterienladung verschiedener Erdeproben, deren Untersuchung mit der Plattenprobe und gleichzeitig mit der direkten Zählung der Schizomycetenhäufchen am Mikroskop erfolgt war, macht Verf. mehrere Bemerkungen über die Unsicherheit der Resultate falls man sich ausschliesslich der klassischen Plattenmethode bedient. Mit der Aenderung der Nährböden und des Verdünnungsgrades treten die zahlenmässigen Unterschiede noch mehr in den Vordergrund, selbst ohne Berücksichtigung des Antagonismus der während des Wachstums auf der Platte Zahl und Art der Bakterien gegenseitig ausüben können.

Verf. hält ein Uebereinkommen unter den landwirtschaftlichen Bakteriologen für wünschenswert, damit das Studium der Bakterienladung des Erdbodens mit einer einheitlichen Methode ausgeführt wird. Er macht unter anderem den Vorschlag die mit der Plattenmethode und mit der direkten mikroskopischen Zählung erhaltenen Daten im Durchschnitt zu berechnen und zu verwerten.

BIBLIOGRAFIA

(1) *J. Conn* - The microscopic study of bacteria and fungi in Soil. «Tecn. Bulletin», n. 64 (New York Agr. Exp. Station), 1918.

(2) *G. Rossi e S. Riccardo* - Il metodo delle piastre disseminate come metodo di conta dei batteri (Note sperimentali). «Ann. del R. Ist. Sup. Agr. di Portici», 1934, 7, pp. 1-18.

(3) *G. Rossi e M. Stanganelli* - Della attendibilità del «metodo Rossi» per la conta dei «glomeruli batterici» nel terreno agrario. «Ann. del R. Ist. Sup. Agr. di Portici», 1932, 5, pp. 233-268;

(4) *E. Casoria* - Mutamenti chimici che avvengono nelle lave vesuviane per effetto degli agenti esterni e della vegetazione. Stab. Tip. Vico Tiratorio 25, Napoli, 1888.

(5) *J. Conn* - On the microscopic method of studying bacteria in Soil; «Soil Science», 1928, 2, p. 257-259.

(6) *S. Winogradsky* - Études sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode. «Ann. de l'Inst. Pasteur», 1925, 39, pp. 299-354.

(7) *S. Winogradsky* - Études sur la microbiologie du sol. (Deuxième mémoire). Sur les microbes fixateurs d'azote. «Ann. de l'Inst. Pasteur», 1926, 40, p. 455-520.

(8) *S. Winogradsky* e *J. Ziemecka* - Études sur la microbiologie du sol. (Troisième mémoire). Sur le pouvoir fixateur de terres. «Ann. de l'Inst. Pasteur», 1928, 42, pp. 36-62.

(9) *M. Koffman* - Eine Methode zur direkten Untersuchung der Mikrofauna und der Mikroflora des Bodens. «Centr. für Bakt.» II Abt. 1928, 75, pp. 28-45.

(10) *F. Löhnis* - Der heutige Stand der Bodenbiologie. «Mitteilungen der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft». Anno 43, Berlin, 1928, page 739-743.

(11) *G. Rossi* e *G. Gesuè* - Di un nuovo indirizzo nello studio biologico del suolo. «Annali di Tecnica Agraria». Roma, 1930, fasc. 2, pp. 196-248.

(12) *H. G. Thornton* e *P. H. Gray* - The number of bacterial cells in field soils, as estimated by the radio method. «Proc. Roy. Soc. London», 115, 1936, pp. 522-543.

(13) *G. Truffaut* e *M. Lefouin* - De l'influence de la microflore du sol sur la végétation du blé. «Compt. Rendus de l'Acad. des Science», Paris, 1933, 97, pp. 787-789.

(14) *Yellow Hwang* - Ueber die Möglichkeiten der logarithmischen Darstellung des Mikroorganismenzahlen. «Archiv Mikrobiol.», 1938, 9, pp. 253-267.

(15) *G. De' Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica, U.T.E.T., 1927, p. 1031.

(16) *S. A. Waksman* - Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: I. The mathematical interpretation of numbers of Microorganisms in the soil. «Soil Science», 1922, 14, pp. 81-100.

(17) *S. A. Waksman* - Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: II. Methods of the study of numbers of Microorganisms in the soil. «Soil Science», 1922, 14, pp. 283-98.

(18) *S. A. Waksman* - Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: III. Influence of fertilization upon numbers of Microorganisms in the soil. «Soil Science», 1922, 14, pp. 321-46.

(19) *S. A. Waksman* e *E. B. Fred* - A tentative outline of the Plate

method for determining the number of Microorganisms in the soil. « Soil Science », 1922, 4, pp. 27-28.

(20) G. *De' Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica. U.T.E.T., 1927, p. 1027.

(21) *T. Castelli* - Ricerche microbiologiche su parcelle di un medesimo terreno coltivato a grano e diversamente concimato. « Atti del IV Congresso Nazionale di Microbiologia », Milano, 3-4-5 ottobre 1932.

(22) *O. Verona* - Studio microbiologico di un terreno torboso. « Rendiconti Reale Accademia Lincei », Roma, 19, 1934, p. 354.

(23) *O. Verona e C. Petroselli* - Note batteriologiche su di alcuni terreni delle « Biancane » di Volterra (Pisa). « Nuovi Annali dell'Agricoltura », Roma, Anno 15, N. 2, 1935, p. 318.

(24) *L. E. Topping* - The predominant Micro-organisms in Soils. I. Description and Classification of the Organisms. « Centralbl. für Bakt. » II Abt., B. 97, N. 14-17, 1937, pp. 289-304.

(25) *L. E. Topping* - The predominant Micro-organisms in Soils. II. The relative Abundance of the different types of Organisms obtained by plating, and the relation of plate to total Counts. « Central für Bakt. » II Abt., Bd. 98, N. 10-15, 1938, pp. 193-201.

(26) *H. W. Julius* - Een methode voor het tellen van levende bacterien, vervanging voor de plathmethode. « Antonie van Leeuwenhoek », 5, N. 1, 1938.

(27) *J. S. Borodoulina* - Les rapports entre les Actinomycetes du sol et « Bac. mycoides ». « Microbiologie », 4, fasc. 4, 1935, pp. 561-586 (dal russo).

(28) *S. A. Waksman* - Associative and antagonistic effects of microorganisms. I. Historical review of antagonistic relationships. « Soil Science » 42, 1937, p. 51-58.

(29) *S. A. Waksman and J. W. Foster* - II. Antagonistic effect of microorganisms growing on artificial substrates. *Ibidem*, 43, 1937, p. 69-76.

(30) *S. A. Waksman and Imri J. Hutchings*. III. Associative and antagonistic relationships in the decomposition of plant residue. *Ibidem*, 43, 1937, p. 77-92.

(31) *M. I. Nachimowskaja* - Der Antagonisms zwischen den Aktinomyzeten und Bodenbakterien. « Microbiologie », 6, fasc. 2, 1937, pp. 131-157 (dal russo).

(32) *C. Arnaudi* - Alcuni aspetti della vita microbica del terreno (Pro-lusione letta il 15 gennaio 1940 nella R. Università di Milano).

(33) *C. L. Whittles* - The determination of number of bacteria in soil. « Journ. Agr. Science ». 13, pp. 18-48, 1923; 14, pp. 346-369; 1924.

Ricerche sui fermenti lattici

Dott. I. Politi

(Ricevuto il 20 Maggio 1940)

NOTA I

STUDIO E RIFERIMENTO SISTEMATICO DEI BATTERI ACIDIFICANTI DEI FORAGGI INSILATI

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

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

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

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

CARATTERI MORFOLOGICI

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

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

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

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

I caratteri particolari dei singoli ceppi possono essere così riassunti:

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

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

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

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

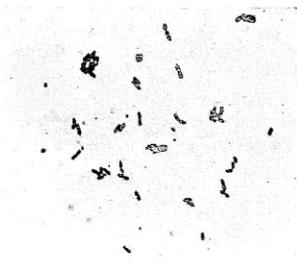
In brodo glucosato: catene più o meno lunghe e variamente incurvate costituite da elementi di 0,7- 0,9 x 0,6 μ , simili a streptococchi ovali. In agar-brodo glucosato alto strato (coltura per diffusione): bastoncini di 1-1,5 x circa 0,5 μ .



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



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



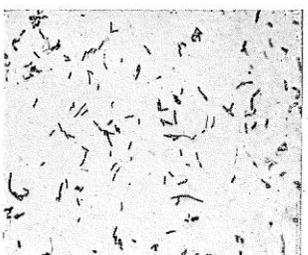
Ceppo 13 T. Coltura in agar gluco-
sato alto strato. Ingrand. 850 diam.



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



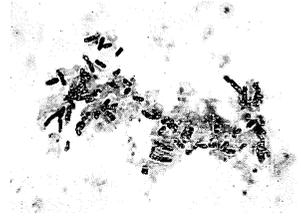
Ceppo 14 B. Coltura in infuso
d'erba. Ingrand. 1050 diam.



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



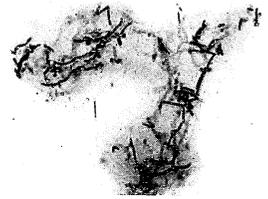
Ceppo MP. Coltura in brodo malto.
Ingrand. 850 diam.



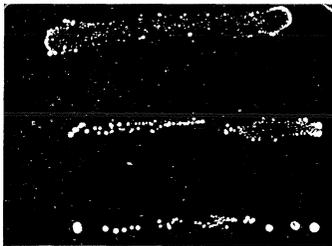
Ceppo 4. Coltura in infuso d'erba.
Ingrand. 1050 diam.



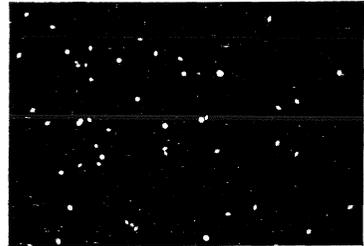
Ceppo 14. Coltura in infuso d'erba.
Ingrand. 1050 diam.



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



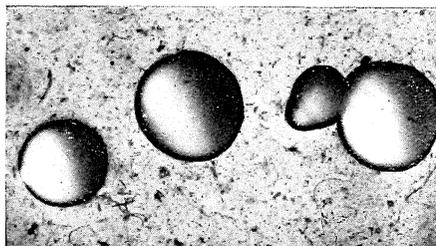
Ceppo SP. Striscio su agar glu-
cosato.



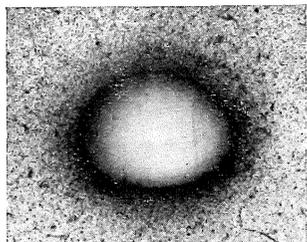
Ceppo SP. Coltura per diffusione
in agar glucosato.



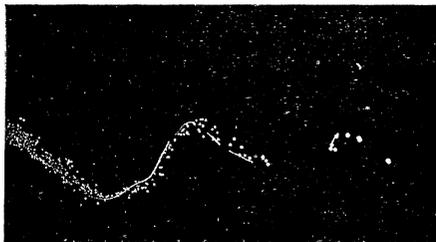
Ceppo SP. Coltura per diffusione in agar glucosato.



Ceppo 14 B. Colonie superficiali su agar glucosato.



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



Ceppo 14. Striscio su agar glucosato.

Ceppo 6 B - Batteri di 1-2,5 x 0,5-0,7 μ , per lo più disposti in catene.

Ceppo 13 B - Batteri di 1-3 x 0,6-0,7 μ , isolati o in catene.

Ceppo 12 B - Simile al precedente.

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

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

Ceppo MP - Batteri di 1-3 x 0,4-0,6 μ , per lo più isolati, talvolta in filamenti, di rado in corte catene.

Ceppo 4 - Batteri di 1-3 x 0,5-0,7 μ talvolta isolati o in brevi catene, ma spesso in catene lunghe ed incurvate.

Ceppo 20 - Batteri di 1-2,5 x 0,4-0,6 μ , isolati o in brevi catene; qualche volta in filamenti.

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

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

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

CARATTERI COLTURALI E FISIOLOGICI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Infuso d'erba — Sviluppo assai pronto con intensa acidificazione, forte intorbidamento e formazione di assai abbondante deposito ¹⁾. È questo il terreno nel quale tutti i ceppi studiati crescono meglio e ciò sta a dimostrare che essi trovano nei succhi vegetali le più favorevoli condizioni di sviluppo.

COLTURE PER STRISCIO (Semina da malto coltura)

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

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

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

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

COLTURE PER INFISSIONE (Semina da malto colture)

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

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

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

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

COLTURE PER DIFFUSIONE IN SCATOLE PETRI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Assenza di spore.

Gram-positività.

Mancanza di potere fluidificante per la gelatina.

Intensa produzione di acidi nei terreni provvisti di zuccheri.

Sviluppo in profondità nei terreni solidi.

Nessuna produzione di indolo.

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

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

FERMENTAZIONE DEGLI IDRATI DI CARBONIO

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

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

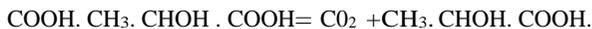
Il potere fermentativo venne studiato mediante coltura in acqua peptonata a pH = 6,5 - 6,7; per i ceppi 14, 4, 20, che non crescono in questo terreno, anche se addizionato di zuccheri, venne impiegato il brodo comune a base di estratto Liebig. Le prove di fermentazione vennero compiute in provette contenenti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

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

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

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

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



Cioè con l'andamento della nota fermentazione malolattica.

PRODOTTI DELLA FERMENTAZIONE ACIDA

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

TABELLA I — POTERE FERMENTATIVO

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

+ = Fermentazione decisamente positiva
 (+) = Fermentazione debole
 ? = Fermentazione dubbia
 — = Nessuna fermentazione

TABELLA II — CARATTERI DIFFERENZIALI

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

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

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

PRODUZIONE DI GAS

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

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

RIFERIMENTO SISTEMATICO

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

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

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

— l'optimum di temperatura;

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

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

CEPPI SP, MP, CP

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Agar comune striscio — Lievissima crescita di colonie puntiformi staccate.

Brodo comune — Scarso sviluppo.

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

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

Patata alla Roux — Nessuna crescita.

Non produce indolo.

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

Microaerofilo.

Ottimo di temperatura 30-37°.

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

Per il complesso dei loro caratteri questi quattro ceppi appaiono riferibili alla specie *Streptobacterium plantarum* Orla Tensen (*Lactobacillus plantarum* Bergey et al.) ¹⁾. A questa conclusione si è pervenuti anche in base ad un confronto sperimentale all'uopo istituito ²⁾. In realtà si è potuto constatare che dal punto di vista morfologico e colturale non si avevano differenze tali da lasciare dubbi su codesto riferimento; qualche differenza invece emergeva dal confronto dei caratteri fermentativi, come si rileva dal seguente prospetto:

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

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

CEPPI 20, 14, 4

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

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

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

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

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

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

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

CEPPI 12 M

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

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

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

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

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

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

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

Agar comune striscio — Lievissima crescita di colonie puntiformi staccate.

Brodo comune — Scarso sviluppo.

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

Patata alla Roux — Nessuna crescita.

Non produce indolo.

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

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

Microaerofilo.

Ottimo di temperatura 30-37°.

CEPPO 13 T

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

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

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

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

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

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

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

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

Brodo comune — Scarso sviluppo.

Latte — Acidifica coagulando dopo 2-4 giorni.

Patata alla Roux — Nessuna crescita.

Non produce indolo.

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

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

Microaerofilo.

Ottimo di temperatura 40-45°.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

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

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

Leuconostoc herbarum.

Micrococcus pratensis.

Lactobacillus sili.

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

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

ZUSAMMENFASSUNG

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

beschriebenen nicht zu identifizieren sind. Für diese letzteren werden folgende Bezeichnungen vorgeschlagen:

Leuconostoc herbarum.

Micrococcus pratensis.

Lactobacillus sili.

RÉSUMÉ

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

BIBLIOGRAFIA

(1) *I. Politi* - Ricerche sui foraggi insilati - Nota I, II, III (Annali della Sperimentazione Agraria, 1938, 29, pag. 75, 89, 95).

I. Politi - *G. Pepoli* - Ricerche sui foraggi insilati - Nota IV - Ed. Biazzi - Milano, 1938.

C. Arnaudi - Ricerche sui microorganismi acidificanti dei foraggi insilati (Atti R. Acc. dei Lincei 1938, 28, pag. 157).

(2) *Orla Jensen* - The lactic acid bacteria, Kopenhagen 1919.

(3) *Fred. Peterson, Davenport* - Journal of Biological Chemistry 1919, 29, pag. 346; 1919, 39, pag. 358; 1920, 42, pag. 175.

(4) *Henneberg* - Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien. P. Parey, Berlin 1903.

(5) *C. S. Pederson* - Journal of Bacteriology 1936, 31, pag. 217.

(6) *C. S. Pederson* - Journal of Bacteriology 1938, 35, pag. 95.

(7) *M. H. Van Laer* - Les troubles bacteriens de la bière. Annales des fermentations, 1937, 3, pag. 354.

(8) *G. De Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica, U.T.E.T., Torino 1927.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology - fifth edition. Baltimore 1939.

Osservazioni sulle variazioni della microflora del latte della prov. di Milano

Dott. Elisa Corberi

(Assistente)

(Ricevuto il 15 Luglio 1940-XVIII)

Nel marzo del 1937 iniziammo un controllo della carica batterica del latte prodotto nella zona immediatamente circostante la città di Milano e che viene consegnata alla Centrale del latte della città per la pastorizzazione.

Il nostro scopo era di osservare l'andamento stagionale della carica batterica complessiva e ricercare la presenza dei microrganismi del gruppo *coli-aërogenes* e dei butirrici nei vari mesi, ed infine anche d'indagare se apparissero relazioni di qualche entità tra alimentazione delle bovine e carica batterica.

Le stalle prese in osservazione furono diverse, ma il maggior numero di campionamenti vennero eseguiti in due, una in zona asciutta, a nord di Milano, sulla strada Milano-Como tra Affori e Bruzzano, l'altra verso sud in zona di marcita, proprio alle porte di Milano, sulla strada provinciale Milano-Pavia.

Purtroppo la ricerca non la si potè compiere senza interruzioni poichè in tutte e due le stalle si ebbero infezioni aftose a più riprese, che durarono in qualche caso anche parecchi mesi e che ci costrinsero a sospendere per tutto il periodo della malattia il lavoro di raccolta dei campioni.

Lo studio dal marzo 1937 si protrasse fino al luglio 1939.

Le stalle furono scelte col criterio che si equivalessero per quanto possibile dal punto di vista della tenuta igienica, ed in secondo luogo, per complesso aziendale e per destinazione del latte.

La stalla in zona asciutta tra Afrori e Bruzzano, ha la facciata principale orientata a mezzogiorno, dimensioni di $54 \times 9,20$ m. ed altezza di 3,60 m. È provvista di ampie e numerose finestre e di 4 porte disposte due a metà dei lati maggiori e altre due alle testate. Il pavimento è in cemento con un cordone di mattoni vicino al margine della zanella ed un altro al margine della posta, che è sopraelevata di circa 20 cent. rispetto alla corsia centrale.

Il soffitto costruito a voltini in muratura, ha parecchie aperture quadrate per il passaggio del fieno. Tutto l'ambiente è imbiancato a calce.

Le mangiatoie, del tipo a rastrelliera di ferro, sono disposte lungo le pareti e sono provviste di abbeveratoi e d'acqua potabile. La stalla è affiancata ai due lati maggiori da un ampio porticato largo una decina di metri; sopra vi è il fenile. Verso nord, alla distanza di una decina di metri dalla

stalla è situata la concimaia, con piattaforma di cemento e pozzetto per la raccolta dei liquidi.

Lo stanzino di raccolta del latte, è sotto il portico, appoggiato alla parete di mezzogiorno, ed ha dimensioni di $3,5 \times 2$ m.; le pareti sono imbiancate a calce ed il pavimento è in cemento; esso contiene un apparecchio refrigerante ad acqua corrente, provvisto in alto al punto d'entrata ed in basso al punto d'uscita, di filtri d'ovatta. Di qui, per mezzo di un imbuto, a sua volta fornito di altro filtro d'ovatta, passa in due grossi secchioni in cui rimane circa un'ora, cioè il tempo che di solito trascorre prima che sia versato nei bidoni e caricato sul carro che lo porta alla Centrale.

Le bovine sono in media 65, di cui in produzione circa una cinquantina; sono tutte della razza bruna delle Alpi. La produzione media giornaliera di latte è di 3,6-3,7 ettolitri.

La stalla in zona di marcita è pure, come l'altra, orientata verso mezzogiorno. Ha una superficie di circa 70×10 m. ed è alta m. 4,30. Sui due lati più lunghi si aprono 32 ampie finestre e sotto ad esse sono disposte le mangiatoie a rastrelliera di ferro. È pure provvista di 4 grandi porte disposte in croce. Il pavimento, comprese le poste, anche qui è in cemento, solcato da due zanelle. Il soffitto è a voltini in muratura, con le solite aperture che danno sul fienile situato sopra la stalla. Il locale è imbiancato a calce.

Lungo la parete esposta a mezzogiorno è costruito un porticato della larghezza di 6 metri, e subito antistante a questo c'è la letamaia con piattaforma di cemento e con pozzetto delle dimensioni di 16×10 m.

Lo stanzino del latte è appoggiato alla parete nord della stalla ed ha le dimensioni di $2 \times 1,5$ m.

Le pareti sono completamente ricoperte di piastrelle di ceramica ed il pavimento è in cemento. Il piccolo locale contiene un apparecchio refrigerante ad acqua in tutto simile a quello dell'altra azienda compreso il materiale accessorio.

Le bovine sono in media 105, di cui una trentina tra Olandesi e meticcie e le altre della razza bruna delle Alpi. La produzione media giornaliera varia tra 9-11 ettolitri.

Complessivamente, sia per la costruzione più moderna, più ampia, più arieggiata, per il migliore orientamento dello stanzino di raccolta del latte e sia per la manutenzione lievemente più accurata, possiamo dire che tra le due aziende quella in zona di marcita è di un livello un po' superiore rispetto all'altra.

L'alimentazione delle bovine della stalla in zona asciutta nelle tre annate fu la seguente: durante i mesi invernali, dicembre, gennaio e febbraio, si dava fieno, insilato e dadi Gaslini nelle proporzioni di 14 Kg. di fieno, 3 Kg. di dadi e 8-10 Kg. di silo di granturco; se veniva a diminuire il fieno si aumentava a 18-20 Kg. l'insilato. In marzo ed aprile il fieno veniva in parte sostituito con 30-35 Kg. di erba; dal maggio all'ottobre la razione era costituita da 70-80 Kg. di erba a cui si aggiungevano circa 15 Kg. di trebbie di birra o una piccola quantità di pannello di granturco. In novembre l'erba in media diminuiva a circa 30-35 Kg. per cui si cominciava a dare un po' di fieno, oltre alle trebbie od al pannello di granturco.

Le bovine in zona di marcita ebbero invece nei mesi invernali erba di marcita, fieno e mangime concentrato nelle proporzioni di Kg. 3-4 di concentrati, 10-12 di fieno e 30-35 di erba; nei mesi di marzo-aprile i quantitativi dei concentrati e del fieno diminuivano a vantaggio dell'erba che aumentava fino a 50 Kg.; in maggio, giugno, luglio, agosto e settembre, l'alimentazione era costituita da 5-6 Kg. di fieno e da 60-70 Kg. di erba; in ottobre e novembre ricompariva gradatamente il mangime concentrato ed aumentava il fieno.

Il mangime concentrato, in questa azienda, era costituito da una miscela in proporzioni stabilite di panelli di cocco, arachide, farina di mais, riso, crusca di frumento e palma dum. Nelle tre annate l'alimentazione fu sempre la medesima.

I rilievi furono eseguiti nei seguenti mesi: marzo, aprile, maggio, giugno, luglio, agosto, novembre e dicembre del 1937; gennaio, maggio, giugno, luglio, dicembre del 1938; e gennaio, marzo, aprile, maggio, giugno e luglio del 1939.

Ci mancano i dati dei mesi di febbraio, ottobre e novembre, per la ragione sopra ricordata inerente l'infezione aftosa.

Del latte della stalla in zona asciutta si analizzarono 57 campioni e così pure 57 di quella in zona di marcita.

I campioni di latte venivano presi circa una volta alla settimana per ciascuna stalla. Il prelevamento veniva eseguito alla mattina subito dopo la mungitura e dal secchione dove il latte era raccolto previo passaggio attraverso il refrigerante e filtrazione. Il latte veniva prelevato con una grossa pipetta sterile in quantità di circa 100 cc. e versato in bottiglia con chiusura pure sterile; subito veniva trasportato in laboratorio ed analizzato. Sul latte si facevano le seguenti determinazioni: carica batterica, ricerca del gruppo *coli-aërogenes*, ricerca dei butirrici, ed infine saggio lattozimoscopico.

Per la determinazione della carica batterica si allestivano i seguenti tipi di piastre: per la ricerca degli schizomiceti con agar comune alle seguenti diluizioni 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 5000, 1 : 20.000, 1 : 100.000; per le muffe e per i lieviti con agar malto alla diluizione di 1 : 5000; per i cocchi acidificanti con agar latte e tornasole alle diluizioni di 1 : 5000 ed 1 : 20.000.

Per il *coli-aërogenes* adottammo il terreno culturale di Zavagli al brodo lattosio e verde di malachite al bromo-timolo, in tubi di fermentazione Smith, alle seguenti diluizioni: 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 5000, 1 : 20.000, 1 : 100.000.

La ricerca dei butirrici la si eseguì mediante il sistema di semina in provette di latte con tappo di paraffina: si tenevano provette di latte sterile, provviste sul fondo di circa 1 cc. di paraffina, già insemenate con le diluizioni 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10.000, per 10' in bagno maria a 80°, e dopo un raffreddamento rapido, si ponevano in termostato a 37°.

In fine con la prova lattozimoscopica si valutava, se pure in modo molto grossolano, la qualità prevalente dei microrganismi presenti nel latte, cioè

se erano proteolitici, gassificanti, o acidificanti. In provette di latte sterile si seminavano le seguenti diluizioni del latte in esame: 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10.000, 1 : 100.000. Per il conteggio delle colonie le piastre venivano esaminate una prima volta dopo 24 ore, ed una seconda dopo 72 di permanenza in termostato. Le piastre di agar comune si tenevano a 37°; quelle al malto ed al latte a 30°. Il numero medio dei microrganismi lo si ricavava dall'ultima lettura, facendo la media del numero delle colonie contate nelle piastre allestite con un medesimo terreno culturale alle diverse diluizioni. Nei tubi di fermentazione per il *coli-aërogenes* venivano osservati il cambiamento di colore del brodo e la formazione di gas dopo 24 e 48 ore. Le provette con tappo di paraffina per i butirrici venivano esaminate dopo 24 ore e dopo 8 giorni e così pure quelle della prova lattozimoscopica; nelle prime si osservava se il tappo di paraffina era stato spinto in alto e le modificazioni del latte; nelle seconde si osservava il tipo del coagulo che si era formato (se spugnoso, compatto, con spaccature, sieroso ecc. ecc.).

I°) Contato il numero delle colonie sviluppatesi nelle piastre a diverse diluizioni allestite con agar comune e facendone la media, risalimmo al numero degli schizomiceti presenti per cc. di latte. Dai valori medi delle analisi di ciascun mese calcolammo le medie dei mesi eguali nelle varie annate.

Nella seguente tabella riportiamo i dati così ottenuti:

MESE	N.° degli schizomiceti del latte della fattoria in zona asciutta	N.° degli schizomiceti del latte della fattoria in zona di marcita
Gennaio	119.000	681.000
Marzo	62.000	672.000
Aprile	175.000	628.000
Maggio	165.000	274.000
Giugno	273.000	624.000
Luglio	275.000	712.000
Agosto	283.000	346.000
Novembre	172.000	1.408.000
Dicembre	171.000	1.311.000

Osservando la tabella, anzitutto rileviamo la differenza sensibile del numero complessivo dei microrganismi nel latte delle due provenienze: in quello della stalla in zona asciutta la cifra media annuale si aggira intorno a 150.000; in quello della stalla in zona di marcita intorno a 500.000.

Della prima azienda abbiamo come media più bassa quella del mese di marzo con 62.000 e come più alta quella dell'agosto con 283.000 microrganismi.

Nella seconda la media più bassa è quella del maggio con 274.000 e la più alta è quella del novembre con 1.408.000 microrganismi.

Possiamo suddividere i nostri dati nei seguenti gruppi stagionali: primaverile, estivo ed invernale. Per il latte della prima azienda, in zona asciutta, in marzo, aprile, maggio la carica batterica è molto bassa: s'aggira

intorno a 134.000; in giugno, luglio ed agosto intorno ai 277.000; in novembre, dicembre e gennaio è di 154.000. Tra la cifra dei mesi invernali e quella dei primaverili la differenza è minima, anzi praticamente, si può considerare nulla. Più notevole invece è la differenza tra questi due gruppi di mesi e gli estivi. Infatti abbiamo 277.000 contro 134 e 154.000 negli altri mesi. L'analisi che diede come risultato più bassa carica batterica fu del 25 gennaio 1939 con 24.333 microrganismi; quella che diede la cifra più alta fu del 31 maggio 1938 con 804.200. Non si supera quindi il milione.

È chiaro che causa principalissima dell'aumento dei microrganismi nei mesi estivi dev'essere la temperatura: la refrigerazione del latte risulta più difficile e più lunga per cui i microrganismi hanno avuto maggiore possibilità di moltiplicazione.

Per il latte della seconda azienda che si trova in zona di marcita la carica batterica media è complessivamente più alta. In marzo, aprile e maggio risulta intorno a 524.000 microrganismi; in giugno, luglio ed agosto è di 560.000, ed in novembre, dicembre e gennaio è di 1.133.000.

Notiamo subito prima di tutto una discreta differenza in più di microrganismi rispetto al latte proveniente dalla zona asciutta. Qui non vi è differenza sensibile tra i mesi primaverili e gli estivi. Notevolissima invece è la differenza tra i mesi invernali e gli altri. Infatti si passa dalle medie primaverili ed estive di 524.000 e 560.000 microbi ad una media invernale di 1.133.000: si ha cioè un aumento di circa il doppio di microrganismi. Proprio il contrario di quello che succede nell'altro latte in cui d'inverno il numero dei microrganismi è sempre costantemente più basso che negli altri mesi dell'anno. Il maggio e l'agosto hanno medie più basse rispetto agli altri mesi vicini.

La carica batterica del maggio di 274.000 potrebbe forse essere messa in relazione anche con il netto miglioramento stagionale nel senso che questo potrebbe favorire un miglioramento delle condizioni igieniche delle bovine per cui gli inquinamenti del latte dovuti a deiezioni semi sciolte provocate dal freddo, oltre che dall'alimentazione, tendono a diminuire di molto.

Viceversa in giugno e luglio la carica batterica ritorna di nuovo alta (rispetto a quella del maggio) ed il fatto sembra anche logico, pensando allo sbalzo di temperatura che si ha in questi mesi estivi. La carica batterica media dell'agosto, di 346.000 germi, è la media di tre sole analisi, troppo poche, mi pare quindi, per assegnare a loro un valore assoluto. Ad ogni modo possiamo concludere che complessivamente, se nei mesi estivi c'è un aumento di microrganismi rispetto al maggio, questo è probabile che possa essere provocato dall'innalzamento della temperatura, come avviene nel latte dell'azienda in zona asciutta.

Ci sembra che possa essere questa la ragione per cui la carica batterica dei mesi primaverili ed estivi raggiunge gli stessi valori.

L'analisi che ci dà il numero più alto di microrganismi è del 9 dicembre 1937 con 2.865.000; quella che ci dà il numero più basso è del 3 maggio 1939 con 18.666. Il fatto dell'aumento invernale è notevole, e differenzia nettamente la fisionomia dell'andamento della carica batterica di questa azienda rispetto all'altra.

Ai numeri di microrganismi ottenuti nelle piastre di agar comune do-

vremmo aggiungere quelli sviluppatasi nelle piastre all'agar latte ed al malto e presumibilmente appartenenti rispettivamente ai gruppi degli streptococchi e dei lieviti.

Per la ricerca degli streptococchi lattici contavamo nelle piastre solo le piccole colonie che avevano con evidenza acidificato il substrato. In ambedue i lattii riscontrammo notevoli quantità di questi microrganismi, distribuiti in maniera press'a poco eguale, cioè piuttosto irregolarmente, e in numeri che in media stavano tra i 20.000 ed i 100.000.

Non ci sembra che ci sia una relazione fra la stagione e la quantità dei lieviti; essi sono presenti quasi sempre, ma in misura piuttosto irregolare; l'unica differenza che abbiamo notato è che nel latte dell'azienda in zona asciutta, complessivamente stanno molto al di sotto o raggiungono al massimo 100.000 per cc. Sono infatti 14 le analisi che danno numeri intorno a questa cifra, mentre sono 23 quelle dei lattii dell'azienda in zona di marcita che la superano.

Per quello che riguarda le muffe, tenemmo conto solo delle colonie che si sviluppavano in agar malto. Furono pochi i lattii d'ambidue le provenienze, che diedero muffe. Per il latte dell'azienda in zona di marcita le ritrovammo in 19 casi di cui, 8 avevano muffe in numero minore di 1000, altri 8 intorno a 20.000 e 3 intorno ai 100.000. Nel latte dell'azienda in zona asciutta le trovammo in 14 casi di cui 6 in numero minore di 1000, 5 intorno a 20.000 e 3 intorno a 100.000.

II°) Il gruppo del *coli-ærogenes* lo ritrovammo complessivamente in maggiore quantità e con maggiore frequenza nel latte dell'azienda in zona di marcita.

Nella tabella seguente riporto la media dei risultati delle determinazioni eseguite sui lattii delle due aziende.

COLI-ÆROGENES

MESE	Latte della fattoria in zona asciutta	Latte della fattoria in zona di marcita
Gennaio	+	+++
Marzo	+	+++
Aprile	+	+++
Maggio	++	+++
Giugno	+++	++++
Luglio	+++	+++
Agosto	++	+++
Novembre	+	+++
Dicembre	+	+++

+ il *coli-ærogenes* è presente fino alla diluizione 1 : 1000 compresa
 ++ » » » » » » » » 1 : 5000 »
 +++ » » » » » » » » 1 : 20.000 »
 ++++ » » » » » » » » 1 : 100.000 »

Nel latte dell'azienda in zona asciutta nei mesi più caldi notiamo subito per cc. di latte un maggior numero di *coli-aërogenes*, circa 20.000, rispetto ai 5000 ed ai 1000 dei mesi più freddi, invernali e primaverili.

Nel latte dell'azienda in zona di marcita questi germi invece oscillano intorno a numeri più alti, circa 20.000 nei mesi invernali e primaverili; probabilmente nei mesi estivi vi sono presenti anche in maggior numero, ma poichè non si esige una diluizione intermedia tra quest'ultima e quella ad 1 : 100.000, non ne possediamo il dato preciso.

Possiamo osservare che la media annuale dei *coli-aerogenes* in questi lattii è molto vicina al quantitativo di questi germi che troviamo durante i mesi estivi nel latte dell'azienda in zona asciutta.

III°) La presenza dei butirrici la riscontrammo in piccola quantità sia nell'uno che nell'altro latte. Li ritroviamo in quasi tutti i mesi, ma solo in un piccolo numero di analisi rispetto al totale. Come quantitativo di germi non si hanno mai cifre alte, in genere ci si aggira intorno a circa 1000 microrganismi per cc. di latte. In media li trovammo presenti nel 19 % dei casi in tutt'e due i lattii e distribuiti saltuariamente qua e là nei vari mesi; forse con maggiore frequenza nei mesi invernali e negli estivi in tutt'e due i casi.

IV°) Con il saggio lattozimoscopico, che ci dà grosso modo un indice della natura dei germi in rapporto alla loro eventuale influenza in una successiva lavorazione del latte stesso, giudicavamo buono, poco buono o cattivo il latte a seconda del tipo del coagulo (compatto, digerito, spugnoso ecc.), cui dava luogo.

Ambedue i lattii presentano in parecchie analisi coaguli spugnosi ed abbondantemente serosi anche nelle prime diluizioni. La distribuzione di questi nei vari mesi non ha nulla di particolare: sono forse più frequenti nei mesi estivi nei lattii dell'azienda in zona asciutta. Complessivamente però il loro numero è circa doppio nel latte dell'azienda in zona di marcita rispetto all'altro: infatti nel primo essi raggiungono il 43 % del totale delle analisi e nel secondo il 23 %. Gli altri coaguli in prevalenza sono compatti, del tipo fermento lattico, solo con qualche breve spaccatura; molto pochi sono quelli completamente interi.

CONCLUSIONI

Dobbiamo tener presente che i campioni di latte esaminati erano prelevati non più tardi di un'ora dalla mungitura e che l'analisi veniva compiuta entro un'altra ora e mezza al massimo: cosicchè in totale il tempo a disposizione per la moltiplicazione dei microrganismi era al più di due ore e mezza. Con tutto ciò è da rilevare come il numero dei germi presenti sia assai basso se si confronta con le elevate cifre di schizomiceti che si contano abitualmente nel latte, prodotto in provincia di Milano, o che almeno si contavano nella quasi generalità dei casi fino a pochi anni fa. Abbiamo constatato una decisa differenza fra il latte dell'azienda con marcita ed il latte dell'azienda con prato asciutto: nel primo il numero dei microrganismi sta intorno al mezzo milione e raggiunge come massimo una punta di 2.865.000, mentre nel secondo in

media si sta sui 150.000 microrganismi e non si raggiunge mai il milione. Le cifre mensili della frequenza degli schizomiceti rivelano che nel latte dell'azienda con marcita la carica batterica è press'a poco costante in primavera ed estate e che vi è un sensibile maggior numero di schizomiceti nella stagione invernale; e ci dicono inoltre che nel latte dell'azienda con prato asciutto si ha una carica batterica press'a poco costante in inverno e primavera ed un sensibile aumento nel periodo estivo. La spiegazione più ovvia dei fatti osservati, sia per la differenza di numero degli schizomiceti che per l'andamento stagionale della loro frequenza, sembrerebbe doversi trovare nel tipo di alimentazione. L'inquinamento del latte è più facile quando le deiezioni sono sciolte, ciò che avviene assai spesso per non dire sempre, con l'alimentazione fresca e tanto più con quella frequentemente bagnata della marcita. Per quanto le condizioni igieniche della stalla dell'azienda con marcita siano nel nostro caso superiori, l'inconveniente non può essere eliminato. La spiegazione tuttavia non può essere considerata altro che ipotetica e provvisoria perchè fattori più complessi potrebbero esservi interessati.

Dobbiamo però aggiungere che fu una sola l'azienda con marcita in nostra osservazione, cioè base molto modesta per fare solide deduzioni.

Per quello che riguarda le muffe ed il *B. coli-aërogenes* nulla è dato rilevare che possa essere messo in relazione all'andamento stagionale; appare evidente invece la loro maggiore abbondanza nel latte dell'azienda con marcita. Per i butirrici abbiamo notato che essi sono distribuiti piuttosto irregolarmente nei vari mesi ed in quantità relativamente piccola in ambedue i latti. Infine, con la prova lattozimoscopica abbiamo visto che i coaguli rotti e spugnosi avevano, nel latte dell'azienda con marcita, una frequenza doppia rispetto a quella del latte in zona asciutta.

Con tutto ciò non intendiamo giudicare senz'altro cattivo il latte delle bovine nutrite con erba di marcita, tanto più che il numero di microrganismi dimostrato anche nelle punte più alte (2.865.000) può essere considerato relativamente basso rispetto ai risultati di altre analisi, compiute su latte prelevato in provincia di Milano.

Nelle indagini bibliografiche i dati che trovammo sulla carica batterica media del latte sono piuttosto diversi gli uni dagli altri e non molto numerosi; non riuscimmo a trovare dati particolari sui latti prodotti nelle aziende normali dei dintorni di Milano. Non mancano gli studi riferentisi alla produzione di «latte da consumarsi crudo» (Parvis, Nai, Vaghi, De Filippis ecc.) ma i dati da essi offerti non sono comparabili ai nostri per le speciali condizioni delle aziende produttrici.

Trovammo invece dati per latte prelevato in latterie di altre città italiane: così a Napoli Montefusco (1893) rilevò una media che va da 17.700 a 3.600.000 batteri per centimetro cubico; a Torino de' Gasperi e Sangiorgi (1913) ne riscontrarono da 10.000.000 a 184.000.000; a Genova Gavelli (1897) notò da 110.000 a 38.700.000; a Pisa de' Rossi (1900) ebbe le seguenti medie: inverno 81.000, primavera 654.000, estate 3.800.000, autunno 1.400.000; a Perugia sempre de' Rossi (1927) dà le seguenti medie: inverno 64.800, primavera 298.000, estate 6.550.000, autunno 2.930.000; a Bologna Mondolfo (1933) stabilisce che la media si aggira fra 500.000 e 1 milione, con cifre oscillanti fra 174.000 e

36 milioni. Tutti questi dati non sono però purtroppo fra loro bene raffrontabili in quanto rappresentano il frutto di analisi eseguite con modalità piuttosto diverse le une dalle altre. Alcuni sono il risultato di conteggi di preparati microscopici, altri di conteggi di colonie sviluppatesi in piastre di Petri allestite con substrati culturali diversi a seconda degli autori; è infatti ben noto come anche con piccole variazioni della metodica dell'analisi batterica del latte si abbiano risultati molto disparati. A noi sarebbero interessati dati di analisi antecedenti alla istituzione della centrale per la pastorizzazione del latte di Milano e più precisamente risultati di analisi eseguite pochissime ore (3-4) dopo la mungitura.

In proposito la letteratura non è abbondante.

Dalla Torre G. (1923), a Lodi, riscontrò come carica batterica di latte subito dopo la mungitura, le seguenti cifre: 69.400 - 16.000 - 23.100 - 41.550; lo stesso autore riscontrò nel dicembre 1925, 410.000 germi; nel maggio 1926, 7.182.000; e nel giugno 1926, 1.515.000.

Sacco P. (1932), riferisce che l'ufficio batteriologico del Comune di Milano dà come media, della carica batterica del latte in arrivo alla centrale, le cifre da 600.000 a 1.200.000.

Caserio E. (1934), nella latteria Cabrini di Pavia, trovò in latte fresco crudo le seguenti cifre: 2.830.000, 2.670.000, e 3.800.000.

Arnaudi C. nel 1929, l'anno in cui fu fondata la centrale del latte di Milano, operando nelle nostre identiche condizioni, esaminò parecchie decine di campioni di latte prelevato, in vari mesi dell'anno, direttamente dai bidoni subito dopo la mungitura e provenienti da stalle situate nella zona a sud della città; dalle sue ricerche, che rimasero inedite, risultò che il numero medio dei germi per cc. di latte si aggirava fra i tre ed i quattro milioni. Se pure i risultati delle analisi di questi Autori sono piuttosto lontani tra di loro, però prevalgono le cifre alte per cui i nostri risultati starebbero ad indicare il notevole progresso igienico verificatosi negli ultimi anni nella Provincia di Milano.

Infatti le aziende da noi controllate rappresentano un tipo medio (come attrezzatura e conduzione), di cui si possono trovare molti esempi nella provincia. Tale progresso è dovuto principalmente a due fattori: l'uno è l'esempio dato dalle ottime condizioni igieniche che si realizzarono nelle stalle per la produzione del latte crudo, esempio che fu la migliore propaganda pratica presso gli agricoltori. L'altro è dovuto all'opera di assistenza tecnica svolta dal Consorzio produttori latte di Milano, di cui l'arma più efficace, fu la suddivisione delle stalle consorziate (per mezzo di un metodo di rilievo per punteggio di ciascuna voce che interessa l'igiene della produzione) in cinque categorie, al latte di ciascuna delle quali corrispondono cinque differenti prezzi. Si ha cioè una categoria normale con prezzo base, due categorie superiori: una buona ed una ottima che danno diritto ad una maggiorazione del prezzo per ettolitro; ed infine due categorie inferiori, una mediocre ed una cattiva, per le quali vengono effettuate trattenute sul prezzo per ettolitro. È da augurarsi che l'azione tecnica svolta dal Consorzio, abbia ad estendersi ed approfondirsi diffondendo norme razionali di produzione igienica del latte che torneranno a vantaggio dei consumatori, dei produttori e dell'industria casearia.

RIASSUNTO

Sono stati analizzati durante gli anni 1937-1938-1939 campioni di latte provenienti da stalla in zona di prato asciutto e da stalla in zona di prato a marcita ed è stato controllato l'andamento stagionale degli schizomiceti sviluppatosi entro due ore e mezza dalla mungitura. Premettendo che la carica batterica del latte delle due stalle prese in esame è inferiore a quella abituale in rapporto alle buone condizioni igieniche con cui le stalle sono tenute, si arriva alle seguenti conclusioni: 1° il latte dell'azienda con marcita è più ricco di schizomiceti di quello dell'azienda che ha prato asciutto, e presenta punte massime stagionali in inverno; 2° il latte dell'azienda con prato asciutto è decisamente meno ricco di schizomiceti e presenta punte massime stagionali estive; 3° il latte dell'azienda con marcita è in generale più ricco di muffe e di *coli-aërogenes* dell'altro.

ZUSAMENFASSUNG

In den Jahren 1937-1938-1939, sind Milchmuster aus Ställen in trockenen, u. Rieselwiese (it. marcita) - Gegenden analysiert worden u. gleichzeitig die Entwicklungsmöglichkeiten in den verschiedenen Jahreszeiten der in zwei und einer halben Stunden nach der Melkenzeit entwickelten Schizomiceten untersucht worden. Vorausgesetzt das im Verhältnis zu anderen. Ställen die hygienisch nicht so auf der Höhe sind, die Anzahl der Bacterien in diesen Mustern geringer ist kommt man zu folgenden Schlüssen:

1° Die Milch aus den Rieselwiese – Wirtschaften ist reicher an Schizomiceten als die aus Wirtschaften mit trockenen Wiesen u. beträgt diesbezüglich das Maximum im Winter.

2° Die Milch die aus den Wirtschaften mit trockenen Wiesen stammt ist viel ärmer an Schizomiceten u. erreicht im Sommer das Maximum an Schizomiceten.

3° Die Milch aus Rieselwiese - Wirtschaften ist in allgemeinen reicher an Schimmelpilzen und *coli-aërogenes* als die zweite.

SUMMARY

Samples of milk from dairy stables situated in farms with dry meadow-land, not irrigated and from stables in farms with artificial meadow-land (during the winter), were analysed during the years 1937-1938-1939 with special reference to the seasonal behaviour of the Schizomycetes which develop within 2 ½ hours of the milking.

Supposing that the bacteric content of the milk from both dairies in question is inferior to the average in proportion to the good hygienic conditions in which the dairies are kept, we can draw the following conclusions:

1° The milk from the dairy with artificial meadow-land is richer in Schizomycetes than that from the dairy with only dry meadow-land and shows the highest seasonal points in winter.

2° The milk from the dry dairy-land is decidedly less rich in Schizomycetes and presents maximum points in summer.

3° The milk from the dairy with artificial meadow-land is, in general, richer in moulds and *coli-aërogenes*, than the other.

BIBLIOGRAFIA

Bowers C. S. and Hucker G. J. - The composition of media for the bacteriological analysis of milk. - New York State Agr. Exp. St., Geneva, march. 1935, Bull. n. 228.

Carbone D. - Microbiologia Industriale. - Hoepli, Milano, 1933.

Caserio E. - Osservazioni e ricerche sul latte pastorizzato. - Ann. d'Ig., Dicembre 1934.

Dalla Torre G. - Influenza delle bacinelle nella conservazione del latte. - Ann. Ist. Sper. Caseif. Lodi, fasc. 1-2, 1923.

Dalla Torre G. - La pastorizzazione nei suoi effetti sui microbi del latte e nelle sue applicazioni nell'industria lattiera. - Ann. Ist. Sper. Caseif. Lodi; fasc. 5-6, 1927.

de' Rossi G. - Microbiologia Agraria e Tecnica. - U.T.E.T., 1927.

Mondolfo U. - Indagini batteriologiche sul latte di mercato di Bologna. - Bull. Se. Med., Anno CV, fase. IV, 1933, Bologna.

Renco P. - Microbiologia del latte e dei latticini. - Hoepli, Milano, 1939.

Sacco P. - La produzione del latte da consumarsi crudo nella provincia di Milano. - Comitato Naz. per latte e derivati. Arte officina tipografica romana, 1932.

Zavagli V. - I germi del gruppo *coli-ärogenes* nel latte. - Ann. d'Ig., 1933, XLIII, fasc. I.

Alcuni aspetti della vita microbica del terreno

Prof. Carlo Arnaudi

Direttore

(Prolusione letta il 15. Gennaio 1940-XVIII)

Magnifico Rettore,

Illustri Preside e Professori,

Cari studenti,

Spero vorrete indulgere verso di me se, nell'accingermi a dettare queste note, il mio pensiero è tornato un momento agli anni che in questa Scuola trascorsi come studente. Ci ospitavano allora le silenziose e venerande mura dell'ex Convento dell'Incoronata, piccola oasi di pace e di cadente bellezza in un angolo della tumultuosa città. Il mio pensiero si volge, colmo di riverente gratitudine, verso tutti gli illustri Professori che vi trovai, particolarmente a quelli che purtroppo non sono più: Vittorio Alpe, Ettore Artini, Guglielmo Koerner, Ernesto Marengi, Girolamo Molon, Ettore Paladini. Accanto al nome di questi Maestri famosi consentite ch'io ponga quello di coloro che fuori di questa Scuola, mi iniziarono e guidarono nella vita degli studi: il mio compianto ed indimenticabile Maestro Serafino Belfanti, la cui vita è mirabile esempio di che possa ottenere la pura ricerca scientifica quando sia affiancata e non contrapposta ad alte capacità realizzatrici, ed il Prof. Domenico Carbone che con tanta sapienza ed affettuosa premura mi guidò nei primi anni della mia carriera di sperimentatore.

La filiazione spirituale, non meno di quella affettiva e forse parimenti a quella del sangue, può mirabilmente realizzarsi quando è sentita nella sua vera essenza morale. Essa si rifugia preferibilmente nei cenobi o fra le mura dei laboratori scientifici onde il trapasso del pensiero, frutto di libera e faticosa conquista, ai fratelli più giovani, consegue veramente una sorta di immortalità che accoglie ed elabora nella sua anonimità i valori spirituali di un popolo. Per tale modo il sapere non è arida elencazione di fatti, ma conserva l'impronta del diuturno lavoro e la passione che agitò gli animi entro i quali visse come intuizione e speranza, prima ancora di essere realtà sperimentale.

La storia della Batteriologia, come quella di poche altre scienze, è ricca di questa passione spirituale ed impregnata di un vivo senso d'umanità. Basta la figura di Luigi Pasteur ad illuminarla in maniera veramente singolare anche da questo lato. E la tradizione pasteuriana pure sotto questo aspetto ha dato frutti copiosissimi.

La Batteriologia agraria ha le sue radici negli studi di Batteriologia gene-

rale che, se sono preceduti da originali osservazioni e scoperte fin dal '700, trovano però il fondamento sistematico ed il nucleo dottrinale nelle mirabili scoperte di Pasteur. Si potrebbe anzi dire che la moderna Batteriologia sia nata come Batteriologia agraria. Infatti i primi studi pasteuriani riguardano le alterazioni della birra e le fermentazioni alcoolica e lattica (1857), precedendo di dieci anni le ricerche di Batteriologia patologica. Queste dapprima rivolte alle malattie degli insetti (1865) soltanto sedici anni dopo si interessarono a quelle degli animali domestici (1877) e finalmente a quelle dell'uomo (1878). Furono quest'ultime che richiamarono l'attenzione del mondo scientifico internazionale sull'opera pasteuriana e diedero quel grandioso impulso agli studi microbiologici che voi conoscete.

Ci è grato rammentare per incidenza come nel corso dei suoi studi sulle malattie del baco da seta, Pasteur sia stato in prolungati rapporti scientifici con la nostra Scuola. È noto infatti come Egli corrispondesse per diversi anni su tale materia con il celebre Emilio Cornalia, nostro professore di Zoologia agraria alla cui sapienza Pasteur rese più volte pubblico omaggio, e che visitò durante la Sua permanenza a Milano nel settembre del 1876.

Le possibilità di applicazioni pratiche nel campo delle trasformazioni dei prodotti agricoli, nonchè le utili interpretazioni del complesso fenomeno della fertilità del suolo, indicarono subito quali estensioni di sviluppo teorico e di realizzazioni concrete, potesse offrire la nuova scienza dei micròbi al di fuori della esatta conoscenza che essa recava sulle cause delle malattie infettive dell'uomo, degli animali e delle piante.

Il nostro Paese non fu secondo ad alcuno nel favorire questi nuovi studi così ricchi di promesse; pertanto, auspice il Ministro Baccelli, nel 1902 veniva istituito il Laboratorio di Batteriologia Agraria presso la Scuola Superiore di Agricoltura di Milano (nostra attuale Facoltà di Scienze Agrarie) che, fondata or sono esattamente settanta anni, aveva raggiunto grande rinomanza per l'alto valore dei suoi docenti e per le brillanti affermazioni nel mondo pratico, dei suoi allievi. A fondare e dirigere il primo Istituto di Batteriologia agraria italiano venne chiamato Costantino Gorini che aveva già una bella fama di ricercatore originale, soprattutto nel campo della Batteriologia igienica e lattiera. Il mio illustre predecessore e Maestro legò il Suo nome a diversi importanti capitoli della Batteriologia generale e particolarmente alla Fisiologia dei microrganismi, nel quale campo Egli deve essere considerato un antesignano, particolarmente per le Sue ricerche sugli enzimi microbici, campo di studi che ancora oggidi si presenta come uno dei più difficili ma interessanti e promettenti.

La scoperta da Lui fattane e la Sua trentennale minuziosa ed ostinata indagine intorno ai microrganismi acidoproteolitici, costituisce un altro merito di Costantino Gorini il cui nome è ormai consegnato nella Storia delle scienze microbiologiche. Egli non limitò poi la Sua attività di studioso a problemi teorici ma seppe collegare questi ad importanti applicazioni pratiche di speciale interesse per la Lombardia. Si fece così tenace propugnatore di tutte le providenze tecniche atte a rendere più razionale ed igienica la raccolta del latte e la produzione dei latticini, e diede inoltre un contributo di grande portata allo studio dell'insilamento dei foraggi, il cui valore pratico per l'economia nazionale non è mai stato così decisamente riconosciuto come nei nostri giorni.

Per merito di Costantino Gorini l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica di Milano è noto in tutto il mondo nel campo della Batteriologia casearia, ed il suo illustre fondatore ha ricevuto alti riconoscimenti dalle Autorità politiche e dalle maggiori Accademie italiane e straniere (*).

Anche se altri importanti problemi di Batteriologia agraria saranno in avvenire affrontati dal nostro Istituto, la tradizione legata al nome di Gorini dovrà essere mantenuta e gelosamente conservata, specie oggi che il Regime incita e favorisce la preparazione di tecnici specializzati in tutti i campi delle attività tecnico-agricole, fra le quali primeggiano quelle casearie.

Dei diversi capitoli che costituiscono il dominio della Microbiologia agraria, ho voluto scegliere come argomento della mia prolusione (e non sembri una contraddizione con quanto ho detto precedentemente) quello che pare offrire le minori possibilità di immediate pratiche applicazioni, ma che effettivamente riassume in sé per la sua vastità e per i rapporti che ha con tutti i fenomeni biologico-agricoli, l'intero campo della nostra scienza.

Diverse sono le ragioni che mi hanno indotto a questa scelta in un'occasione così importante per la mia vita di sperimentatore. Alcune di esse dipendono forse dalla mia origine rurale ed hanno perciò un carattere esclusivamente sentimentale, altre sono invece legate alla mia carriera. Undici anni or sono, iniziando il mio insegnamento come libero docente, esaminai infatti nella prelezione al mio primo corso universitario i nuovi orientamenti che la Microbiologia del terreno prendeva in quegli anni. Agli studi di Microbiologia del suolo, verso i quali ero stato sospinto dal mio amato e venerato Maestro Sen. Angelo Menozzi, restai sempre avvinto con viva passione, anche se ad essi non mi fu consentito di dedicare maggior copia del mio tempo. Ma i problemi della Microbiologia del terreno furono sempre presenti al mio spirito anche quando mi occupavano altre ricerche, convinto come sono che al terreno agrario si possano riferire e forse collegare molte questioni che riguardano le altre branche della Microbiologia.

Anche senza considerare che la terra, con i suoi intimi rapporti con l'aria e le acque, può essere riconosciuta la sede naturale e probabilmente la culla di tutti i microrganismi, compresi quelli più strettamente specializzati rispetto all'ambiente, quali sono i patogeni, sappiamo quanto l'Igiene umana e veterinaria e la stessa Patologia generale si interessino del terreno agrario come luogo di raccolta e di diffusione di numerosi micròbi. Basti ricordare quale importanza abbia il terreno nella diffusione delle infezioni tetaniche e carbonchiose.

Del resto l'interesse di queste discipline verso il terreno agrario non riguarda soltanto questo punto di vista, come fa fede il recente indirizzo di studi che considera il terreno come eventuale fonte di microrganismi utilmente impiegabili per la lotta contro le malattie infettive. Un originale esempio di esso ci è stato offerto infatti recentemente con l'utilizzazione di un microrganismo proveniente dal terreno torboso, i cui enzimi disciolgono la capsula dei pneumococchi.

(*) Le pubblicazioni di Batteriologia casearia del Gorini sono in corso di stampa, tradotte in francese ad iniziativa della rivista « Le Lait ».

Si rammenti infine che nel terreno si possono trovare tutti gli agenti di quelle trasformazioni naturali di sostanze organiche che sono poi inconsciamente o razionalmente usati nelle fermentazioni industriali: dai lieviti della fermentazione panaria ed alcolica, agli aspergilli di quella citrica, dai molteplici fermenti che agiscono in varia guisa sul latte, ai microrganismi maceranti le piante tessili. Tutti i microrganismi che interessano i diversi capitoli della Microbiologia agraria e tecnica, si trovano o si possono trovare nel terreno.

Esso è realmente il grande deposito ed in certo senso l'incubatrice di pressochè tutti i microrganismi: ad esso si rivolge, quasi mai invano, lo studioso alla ricerca di qualunque microrganismo, purchè impieghi la tecnica opportuna.

La terra racchiude in sè tanta parte degli elementi che costituiscono il divino mistero della vita, e rinnova di continuo e periodicamente ai nostri dimentichi occhi il miracolo delle messi e dei fiori: il miracolo che ci dona l'alimento ed un sorriso di bellezza. Non è necessario rifarsi agli antichi miti od alle filosofie primitive per considerare la terra elemento primigenio della vita nella origine sua e nel suo perenne rinnovarsi.

Chiunque sappia fuggire la triste meccanicità della esistenza cittadina e respirare un attimo la vita dei campi, chiunque riesca per un momento ad osservare con attitudini non esclusivamente estetiche le campagne verdeggianti, sentirà tutto il fascino che emana il fenomeno primitivo e fondamentale costituito dal trionfo dell'elemento vitale sopra la durissima roccia cristallina, sminuzzata in terriccio fecondo dalla lenta ed implacabile energia dei microrganismi e degli altri fattori biologici.

Per il microbiologo agrario evidentemente la vita microbica del terreno ha un interesse tutto speciale. I processi riguardanti la formazione del terreno, la sua fertilità, l'evoluzione delle sostanze inorganiche ed organiche utili alle piante, sono infatti intimamente legati alla vita dei microrganismi i quali sono altresì in rapporti biologici diretti con la vegetazione.

Per l'agronomo la funzione mineralizzatrice dei micròbi non ha soltanto l'interesse direi quasi filosofico che presenta per il naturalista: per esso la fertilità del terreno è il problema centrale della produzione agraria ed il conoscere quindi la parte che i microrganismi prendono alla sua formazione ed al suo mantenimento, il possederne le leggi che ne regolano l'azione rappresenta uno scopo pratico cui egli tende tutti i suoi sforzi. Le ricerche sui micròbi del terreno sono perciò rivolte soprattutto a quelle attività che interessano direttamente od indirettamente la nutrizione delle piante.

Dalle prime intuizioni di Pasteur e di Duclaux, al fecondo lavoro di ricerche compiuto da tanti studiosi fra i quali brillano per genialità Winogradsky e Beijerinck, molti dei più importanti processi microbici del terreno sono stati chiariti.

Nel primo periodo della storia della nostra scienza venivano messi in luce e minutamente descritti, i micròbi agenti dell'ossidazione dell'ammoniaca, della fissazione dell'azoto atmosferico viventi in simbiosi con le leguminose e quelli liberi nel terreno; quelli determinanti la riduzione dei nitrati, l'ossidazione dello zolfo e le molte specie che determinano con la loro conco-

mitante azione la decomposizione e mineralizzazione delle più complesse sostanze organiche, i microrganismi cioè, che agiscono nella formazione dell'*humus*.

Nonostante la Microbiologia del terreno possa essere considerata la madre della Microbiologia generale, essa ha subito una profonda influenza per quanto riguarda metodi di indagine e tecnica di laboratorio dalla Microbiologia igienica e patologica. Influenza che ha determinato in certa guisa un rallentamento nel suo progresso e che comunque l'ha distolta dallo studio intimamente legato al terreno, cioè dalla indagine immediata dei più complessi fenomeni che si svolgono nel suolo. Quando si consideri che l'attività microbica si svolge nel terreno sotto l'influenza dei succhi secreti dalle radici delle piante, in un ambiente di natura eminentemente colloidale, in continuo variare di equilibrio per l'influenza della vegetazione, delle concimazioni, dei fattori meteorologici, è agevole comprendere come dal sovrapporsi, intrecciarsi, alternarsi di tutti questi fattori fisico-chimici e biologici, la flora batterica debba continuamente mutare e, per così dire, reagire alle nuove condizioni ambientali. Tutto ciò concorre a fare della microflora terricola un insieme di problemi in parte ancora insoluti ed irto di difficoltà tecniche di studio, ma contemporaneamente un ordine di ricerche fra i più suggestivi, anche dal punto di vista naturalistico, che possa colpire la mente del biologo.

Non credo utile ed opportuno rammentare le critiche fatte nell'ultimo ventennio a gran parte della metodica prima impiegata nei nostri studi. Metodica basata sul *mito della cultura pura* e sull'impiego di terreni nutritivi artificiali atti a consentire lo sviluppo più rigoglioso possibile dei microrganismi *in vitro*. Questi irrazionali concetti sperimentali hanno favorito le varie dottrine sul pleomorfismo dei microrganismi terricoli, dottrine che vanno rifiutate perchè prive di seria base sperimentale. Oggidì il microbiologo del terreno si sforza di studiare i microrganismi nel loro *habitat* naturale, direi quasi nella loro giacitura naturale e l'ideale cui tende, sarebbe di poter vedere e seguire nelle loro manifestazioni i micròbi nel terreno stesso. Tutti gli sforzi fatti da Cohn, Rossi e Riccardo, Winogradsky ed altri studiosi per elaborare metodi diretti di osservazione microscopica sono infatti guidati dall'idea di poter vedere i microrganismi nel loro ambiente normale. E allorquando ci si vuole rendere conto delle loro attività specifiche, ond'è necessario farne la cultura pura, si tenta di riprodurre in laboratorio le loro normali condizioni di vita che sono caratterizzate da povertà d'alimento e da lavoro associato. Nel terreno infatti i microrganismi non trovano le proteine e gli zuccheri generosamente offerti nelle consuete culture di laboratorio, ma vivono in concorrenza od in simbiosi con altre specie, utilizzando la scarsa sostanza organica ed i sali minerali ivi diffusi. Essi subiscono inoltre le alterne vicende meteoriche ond'è che la zolla in cui operano può essere satura d'acqua o disseccata dalla lunga siccità; condizioni ben lontane dalle culture in ricche soluzioni nutritive ancora impiegate in molti laboratori.

Le moderne ricerche della Microbiologia del terreno debbono perciò essere aderenti il più possibile alle condizioni naturali e pertanto si debbono escludere in modo assoluto i microrganismi provenienti da collezioni di laboratorio, impiegando invece microrganismi appena isolati dal terreno, col-

tivandoli in mezzi nutritivi i più analoghi possibili a quelli dell'*habitat* naturale. Quando si rende necessario allestire culture pure si impiegano terreni nutritivi ai quali i microrganismi sono ereditariamente abituati, evitando il passaggio sugli usuali mezzi culturali che ne altererebbero le attitudini fisiologiche. Infine si tiene gran conto del fattore biologico che influenza la vita dei microrganismi del terreno: fattore biologico che può essere rappresentato da altri schizomiceti, muffe e protozoi, ed infine e soprattutto dalle piante spontanee o coltivate. Naturalmente la valutazione e più ancora la riproduzione sperimentale del fattore biologico è di estrema difficoltà, il che deve acuire lo spirito di osservazione nello sperimentatore per la esatta percezione del fenomeno e sollecitare la sua fantasia ad escogitare dispositivi atti a riprodurre *in vitro* i fenomeni stessi.

È seguendo questi criteri che la nostra Scienza ha potuto in questi ultimi anni acquisire alcuni importanti fatti e riprendere uno slancio assai promettente, specialmente in quei Paesi ove le viene offerto un posto adeguato accanto alle altre Scienze biologiche.

L'impiego però dei metodi diretti nello studio della microflora del terreno non è ancora universalmente adottato, a tal segno che assistiamo al tentativo di introdurre complicati quanto sterili calcoli matematici, aventi lo scopo di eliminare piccoli errori di numerazione nel conteggio dei microrganismi coltivati in piastre a base di mezzi nutritivi consueti, quando sappiamo che questo metodo offre valori, in certi casi 100 od anche 1000 volte inferiori al numero effettivo dei microrganismi esistenti nel suolo. La quantità infatti di schizomiceti che possiamo trovare nel terreno fertile impiegando metodi adatti al rilevamento, è molto maggiore di quanto non si credesse un tempo. Si tratta talvolta di centinaia ed anche migliaia di milioni di microrganismi per grammo di terra secca. Tale ingente numero di germi è soltanto in piccola parte reperibile nei liquidi circolanti nel terreno; è il complesso solido che alberga i microrganismi, li trattiene e in certa guisa li assorbe. Conseguenza da ciò la estrema influenza che sulla vita dei microrganismi è esercitata dalla struttura fisico-meccanica del terreno. Alcune mie osservazioni, fatte in proposito, secondo le quali la quantità dei microrganismi è tanto maggiore a parità di altre condizioni, quanto più i terreni sono ricchi in costituenti colloidali, sono state poi confermate da Novogradsky che per altra via ha constatato come il potere di assorbimento dei terreni rispetto ai microrganismi e la ricchezza della microflora del terreno siano in diretto rapporto con la quantità di particelle fini del terreno stesso.

Il fenomeno più appariscente ed anche fondamentalmente più importante della funzione dei microrganismi nel terreno agrario è indubbiamente quello che si riferisce alla formazione ed evoluzione dell'*humus*. Questa speciale sostanza del terreno fertile costituisce veramente il grande deposito per la materia viva della terra. Esso può essere quasi considerato come un immenso materiale di riserva per l'esistenza di tutti gli esseri viventi, ed in certa guisa è vivente esso stesso e rappresenta in pari tempo un termine di passaggio fra il mondo inorganico e il mondo organico. Si rammenti a questo proposito come la quantità di carbonio dell'*humus* del terreno sorpassi per decine di volte quella legata alla materia vivente. I principali agenti

della formazione e delle successive trasformazioni di questa imponente massa di sostanza organica sono indubbiamente i microrganismi e pertanto non è possibile conoscere l'intima natura della funzione e del dinamismo dell'*humus* se non si tiene conto delle attività biochimiche, così spesso a carattere specifico, che in esso svolgono i micròbi.

Fenomeno fondamentale della formazione dell'*humus* è la degradazione dei residui vegetali naturalmente od artificialmente portati sul terreno, od in altre parole: la scomposizione della cellulosa e della lignina. La degradazione della cellulosa è stata chiarita negli ultimi anni dalla scoperta del gruppo dei cellulolitici aerobi del tipo delle citofaghe, che se presenta ancora alcuni lati oscuri nei riguardi del metabolismo e della posizione sistematica, non offre dubbi sulla importanza della loro funzione per la rapida e profonda attività idrolitica esplicata sulle cellulose. La loro diffusione è strettamente legata a condizioni chimico-fisiche del terreno che delimitano i terreni normali e fertili da quelli eccessivamente acidi od impaludati o comunque anormali e sterili. Si potrebbe quasi considerare la loro presenza e il loro numero quale indice di normalità se non di fertilità di un terreno. Del resto la loro azione biochimica sembra svolgersi non soltanto in seno al terreno agrario ma anche estendersi a funzioni fisiologiche nei riguardi della digestione delle ingenti masse cellulose ingerite dagli erbivori. Già da alcuni anni ho potuto seguire in diverse specie di erbivori la presenza e la regolare distribuzione nell'intestino di questi animali, degli aerobi cellulolitici che si localizzano e si moltiplicano in quegli organi del sistema digerente che albergano più a lungo le masse dei foraggi ingeriti. Recentemente poi Baldacci e Verona hanno messo in evidenza l'esistenza di questi cellulolitici nell'intestino delle termiti, ed a tali micròbi essi attribuiscono l'attività sulle cellulose esplicata dalle termiti stesse.

Accanto a queste forme altri schizomiceti da tempo noti come il *B. melanigenes* ed il *B. fossicularum* di Omeliansky e quelli più recentemente studiati dal Clausen e da altri e i diversi microrganismi termofili ultimamente descritti, contribuiscono alla degradazione delle cellulose vegetali, ma essi hanno forse maggiore importanza per i terreni paludosi o comunque molto ricchi d'acqua. Nella normale formazione dell'*humus* invece, accanto agli schizomiceti aerobi notevole importanza deve essere attribuita a molti ifomiceti, specialmente quando la loro azione si svolge in concomitanza per non dire in stretta associazione, con batteri ed actinomiceti. Recentissime ricerche di S. Krzemeniewski e H. Krzemeniewska hanno dimostrato come alcuni myxobatteri del genere *Sorangium* (*compositum* e *nigrescens*) presentino un notevole potere cellulolitico almeno *in vitro* su cellulosa pura e su fibre tessili. Imsenecki e L. Solnteva hanno confermato le stesse osservazioni notando come in condizioni favorevoli di ambiente, cioè in aerobiosi ed a una concentrazione idrogenionica da 6.5 ad 8, dal 50 al 75% dei materiali cellulolitici vengano rapidamente decomposti.

Accanto alla cellulosa anche la lignina ha grande importanza come materiale di formazione di *humus* e circa la sua trasformazione, le nostre scarse conoscenze sono state ultimamente arricchite dalle interessanti esperienze di Waksman e Hutchings che poterono dimostrare l'attività di diversi schizomiceti terricoli, operando *in vitro* su lignina fenolica.

Quanto riguarda il ciclo dell'azoto nel terreno è stato oggetto di numerosissime ricerche particolarmente per quanto si riferisce alla fissazione dell'azoto atmosferico. La natura della fonte energetica necessaria agli azotobatteri per la loro importante funzione, costituiti per lungo tempo uno degli argomenti più dibattuti: è altro merito di Winogradsky l'aver dimostrato come molti dei prodotti delle più frequenti fermentazioni che hanno luogo nel terreno, possano fornire l'energia necessaria per l'attività fissatrice degli azotobatteri come ad es. l'acido butirrico, lattico, succinico e vari alcoli. Date le condizioni di simbiosi in cui avvengono tutte le trasformazioni di sostanza organica nel terreno, è agevole comprendere come gli azotobatteri possano vivere a fianco degli agenti di fermentazione delle proteine e degli idrati di carbonio e possano utilizzarne i prodotti.

Anche l'intimo meccanismo a mezzo del quale questi micròbi fissano l'azoto ha avuto un ulteriore chiarimento. La fissazione si esplicherebbe infatti attraverso l'idrogenazione dell'azoto molecolare: una deidrogenasi, operando sulle materie di riserva della cellula microbica e probabilmente anche su quelle delle cellule morte, fornisce idrogeno attivo per il quale l'azoto atmosferico fungerebbe da *accettore*. Il chimismo della fissazione dell'azoto per il quale nel 1927 lo Stapp constatava amaramente il più assoluto *ignoramus* pare quindi avviato verso una risoluzione e la messa in evidenza della produzione di ammoniaca nelle culture naturali di azotobatteri, conferma l'attendibilità che l'ipotesi della idrogenazione dell'azoto corrisponda alla realtà dei fatti.

Anche quanto riguarda la fissazione dell'azoto atmosferico per opera di microrganismi in simbiosi con leguminose, pare abbia un meccanismo analogo, poichè la formazione di ammoniaca è stata più volte constatata da Winogradsky, Virtanen e von Hansen nei noduletti radicali delle leguminose. In questo caso l'idrogenazione è la conseguenza della *simbiosi in atto* fra il microrganismo ed il tessuto vegetale, infatti il *Rh. radicolare* separato dalla pianta non è capace di fissare azoto atmosferico ed è soltanto quando si trova in intimo contatto con i tessuti vegetali, che probabilmente forniscono non soltanto nutrimento ma pure qualche principio a carattere enzimatico, che il microrganismo può esplicare la sua azione fissatrice.

Questa constatazione è del più alto interesse. Essa dimostra come la simbiosi fra pianta e micròbo consenta una nuova interessantissima funzione che nè pianta nè micròbo separatamente considerati, hanno la possibilità di compiere. Molto probabilmente questo caso di simbiosi rappresenta soltanto un esempio di quella che deve essere la regola della vita microbica del terreno. I nostri metodi d'indagine sono necessariamente a carattere analitico e studiano perciò i vari fenomeni separatamente. In tal modo è probabilissimo che molti casi di simbiosi abbiano a sfuggirci. La simbiosi *Rh. radicolare* e leguminose cade sotto la nostra osservazione soltanto perchè raggiunge una entità morfologica: il tubercolo. Nel terreno è probabile che infiniti altri casi analoghi abbiano ad avverarsi, pur senza raggiungere una intimità di questo tipo o di quella che alghe e funghi conseguono nella formazione dei licheni. In ogni caso i rapporti dei microrganismi fra di loro e con le radici delle piante superiori avvengono attraverso un complicato sistema di antagonismi

e di simbiosi, di azioni concomitanti e di concorrenze alimentari, di successioni, repentine scomparse, improvvisi arricchimenti di specie, a seguito del continuo mutare dell'ambiente. Non soltanto la fertilità nel comune senso intesa, ma anche i fenomeni atipici che ne costituiscono deroghe o varianti, come la stanchezza del terreno, i fatti di intolleranza fra specie e specie di piante coltivate, hanno le loro estreme radici in questi complicati fenomeni di relazioni e reazioni biologiche.

È probabilmente in questa direzione che l'indagine scientifica potrà raccogliere fatti nuovi. Del resto, considerando la vita microbica del terreno da questo punto di vista, possiamo constatare come alcuni fenomeni della pratica agraria ne vengano illuminati e quanti collegamenti si possano istituire con altri importanti problemi di biologia vegetale.

Il comportamento di molte specie microbiche viventi nello stesso ambiente, raramente è di reciproca indifferenza, più spesso è di mutuo vantaggio o di intolleranza. Sono questi due ultimi i casi che presentano maggiore interesse per noi; essi costituiscono l'antagonismo e la simbiosi, i due aspetti fondamentali cioè, che riguardano la convivenza di tutti gli esseri.

La più semplice causa di antagonismo è rappresentata dalla concorrenza alimentare, ma più spesso l'antagonismo è causato da modificazioni ambientali indotte dal metabolismo dei microrganismi, modificazioni che possono avere anche carattere chimico-fisico nei riguardi soprattutto della densità del mezzo, della concentrazione idrogenionica, della viscosità, della tensione superficiale ecc. Le variazioni di queste proprietà fisiche dei liquidi nutritivi hanno, in parte almeno, dato ragione di alcuni tipici antagonismi microbici studiati *in vitro* da Kopaczewski, Rosnowski e da me.

Le attività metaboliche dei micròbi, esercitandosi essenzialmente con l'elaborazione di enzimi, non è improbabile che possano dar luogo anche ad antagonismi dovuti ad attività diastasiche od alla formazione di vere sostanze tossiche elaborate specialmente dagli ifomiceti. Il limite del resto fra natura enzimatica e tossica di quest'ultime sostanze non è perfettamente delimitato, esse presentano anzi comunità di caratteri, analogamente a quanto il Belfanti ha messo in luce per alcune tossine agenti sugli animali superiori ed intravvisto per altre.

Questi fenomeni d'antagonismo microbico possono assurgere ad una importanza particolare quando speciali condizioni d'ambiente, come ad esempio eccessiva acidità del suolo, elevato grado di umidità, lunga persistenza di determinate colture, ecc. causano un eccessivo prevalere di quelle particolari forme microbiche che caratterizzano i terreni anormali.

I fenomeni di simbiosi per contro, sono caratterizzati da reciproco vantaggio ed è probabile che costituiscano la norma nello svolgimento dei fenomeni dovuti alla microflora terricola. Purtroppo la documentazione sperimentale da noi posseduta in questo campo è molto modesta; il maggior numero di esempi di simbiosi fra specie batteriche non ci è offerto dai micròbi del terreno ma da quelli che interessano le fermentazioni dei prodotti agricoli. È infatti assai facile constatare e riprodurre sperimentalmente le trasformazioni che si svolgono nelle fermentazioni industriali ad opera di associazioni batteriche, poichè in questo caso il substrato è noto e sterilizzabile

mentre nel suolo queste due condizioni essenziali vengono completamente a mancare. Ma quanto non è possibile ancora dimostrare sperimentalmente riproducendo questi fenomeni naturali, è però consentito per ora dedurre dalle ampie conoscenze che abbiamo intorno alla biologia dei singoli microrganismi e dagli esempi di funzioni analoghe offertici dalla biologia generale.

Una delle forme di simbiosi più facilmente riscontrabile nel terreno agrario è quella che ha luogo fra anaerobi ed aerobi, sicchè anche i più esigenti fra i microrganismi sensibili all'ossigeno e che nelle culture *in vitro* ci costringono ad escogitare complicati sistemi di allevamento, trovano invece nel terreno ottime condizioni di sviluppo. Basti ricordare le frequenti associazioni fra i *Clostridium pasteurianum* e gli *Azotobacter*, ambedue fissatori dell'azoto atmosferico, stretto anaerobio il primo ed aerobio il secondo, che può contrarre a sua volta simbiosi con altri anaerobi ed anche con alghe e piante acquatiche. Parimenti i più stretti anaerobi solubilizzanti le pectine e primi demolitori perciò della impalcatura dei vegetali superiori, possono riccamente svilupparsi nel suolo in virtù della funzione anaerobizzante delle specie aerobiche.

Nell'importante processo di trasformazione della cellulosa, che viene scomposta in masse così imponenti, è molto probabile che l'attività dei microrganismi specifici sia potenziata ed aumentata d'intensità per l'azione concomitante da essi esercitata. Secondo Waksman l'azione eccitante può essere esercitata anche da microrganismi non cellulolitici che influenzerebbero favorevolmente quella dei microrganismi specifici. Egli ha visto così come l'attività ad es. del *Trichoderma lignorum*, sia singolarmente aumentata dalla presenza di altri ifomiceti e di batteri privi per loro conto di ogni azione sulla cellulosa. Analogo fenomeno ha osservato circa l'azione degli actinomiceti sulle lignine e cellulose che vengono decomposte attivamente da questi microrganismi soltanto quando essi sono in presenza di ifomiceti per sè stessi assolutamente privi di ogni attività fisiologica su queste sostanze. In linea generale si può affermare che la popolazione microbica del terreno può provocare processi biochimici diversi da quelli espliciti dai microrganismi singolarmente considerati, specialmente quando le loro attività fisiologiche siano rilevate *in vitro*.

Queste considerazioni ci richiamano alla mente le classiche ricerche di Castellani di Chisimaio, sopra la fermentazione degli idrati di carbonio, operata da ben determinate associazioni di microrganismi che individualmente non danno fermentazione. Onde ne è derivato un metodo di riconoscimento biologico degli zuccheri che applicato alla viceversa permette la identificazione di micròbi a mezzo di fermentazioni associate su zuccheri noti.

Ma un nuovo lato, forse fra i più interessanti, che si possa presentare nelle simbiosi fra microrganismi del suolo nonchè fra essi e le piante superiori, pare a me sia offerto dalla elaborazione dei fattori di accrescimento, che in qualche caso possono essere formati e diffusi da una specie ed utilizzati direttamente o indirettamente da altre. Mi pare pertanto giustificato il soffermarci un poco intorno ad essi.

Il capitolo riguardante i fattori di accrescimento dei microrganismi è uno di quelli che ha maggiormente progredito negli ultimi anni, in con-

sequenza delle fondamentali scoperte che hanno arricchito le nostre conoscenze intorno alla natura chimica ed alle funzioni delle vitamine. Con queste sostanze infatti, i fattori di accrescimento microbici presentano molte analogie fisiologiche ed affinità di costituzione chimica.

Se intendiamo per fattore di accrescimento quelle sostanze di cui il protoplasma microbico è incapace di fare la sintesi e che d'altro canto sono indispensabili per la sua moltiplicazione, è evidente che esse costituiscono una sorta di elemento non comune a tutte le specie microbiche, ma piuttosto legato al metabolismo dei singoli micròbi. In certo senso possono essere considerati fattori d'accrescimento anche alcune sostanze alimentari azotate, che sono indispensabili e non sintetizzabili da molti micròbi. Tale è il caso di alcuni aminoacidi quali il triptofano, la lisina, la cisteina ecc. Ma queste sostanze indispensabili per la crescita dei microrganismi devono però essere presenti in quantità sufficiente, proporzionatamente alle altre sostanze alimentari, secondo la legge del minimo che vale anche per i microrganismi. I tipici fattori di accrescimento sono invece quelli che possono agire a dosi infinitesime e che pertanto fungono da veri catalizzatori dell'accrescimento.

Il lato per noi più interessante della questione è costituito però dal fatto che più specie possono essere sensibili ad un determinato fattore d'accrescimento e che soltanto alcune altre hanno la possibilità di sintetizzare il fattore stesso. Questa constatazione dimostra infatti in modo chiaro come la simbiosi possa costituire la condizione *sine qua non* di vita per le specie incapaci di sintesi se l'ambiente stesso non offre direttamente altre fonti di fattori d'accrescimento come avviene in qualche caso.

Un esempio che illustra questa possibilità ci è offerto dalla Microbiologia generale e riguarda il bacillo di Pfeiffer, tipico fra i batteri emofili, cioè esigenti, per potersi sviluppare, dell'addizione di sangue fresco ai comuni terreni nutritivi.

Il sangue agisce, come dimostrò Davis, arrecando due fattori di cui uno — il fattore X — termoresistente, è stato poi identificato con l'ematina, mentre l'altro, termolabile — il fattore V — è stato poi trovato anche in vegetali diversi, nel lievito, ecc. Il fatto interessante dal nostro punto di vista, è che questo fattore V è elaborato da numerose specie microbiche tra le quali lo stafilococco, che coltivato in associazione con il B. di Pfeiffer, permette a questo di svilupparsi in modo eccezionale e di formare colonie di dimensioni assai più grandi del normale. Evidentemente l'elaborazione del fattore V da parte dello stafilococco ne determina un eccesso di concentrazione che va a favore del primo microrganismo. Recenti lavori di A. ed M. Lwoff hanno potuto dimostrare come il fattore V altro non sia che una cozimasi e precisamente una coidrogenasi, catalizzatore necessario alla respirazione del B. di Pfeiffer, di cui quest'ultimo è incapace di sintesi.

Sembra infatti che molti di questi fattori di accrescimento agiscano nel senso di catalizzare i fenomeni di deidrogenazione che stanno alla base delle ossidazioni metaboliche e respiratorie nei micròbi come nel meccanismo della respirazione cellulare in genere. Così l'aneurina che, come dimostrò ampiamente lo Schopfer, è utile, anche in tracce infinitesimali, a molti microrganismi alcuni dei quali possono anche utilizzare i suoi costituenti derivanti

dalla pirimidina e dal tiazolo, esplicherebbe la sua azione intervenendo nella sintesi della carbossilasi. Hills avrebbe visto infatti che in sua assenza, lo stafilococco aureo coltivato su piruvato, rallenterebbe notevolmente i processi respiratori. D'altro canto la lattoflavina, sostanza indispensabile per la moltiplicazione di svariati microrganismi incapaci di farne la sintesi (fra gli altri i comuni fermenti lattici), è notoriamente il costituente principale del fermento giallo di Warburg. Anche l'acido nicotinic, fattore d'accrescimento per vari micròbi, fra i quali il proteo e lo stafilococco aureo, sarebbe esso stesso legato a fenomeni respiratori poichè entra nella sintesi della coidrogenasi che, come abbiamo ricordato, costituisce il fattore V di Davis.

Un fattore d'accrescimento che sembra essere comune a tutti gli anaerobi sporigeni, essendo essi incapaci della sua sintesi, è stato scoperto nel 1933 da Knight e Fildes. Si tratta di una sostanza diffusa nei tessuti animali e vegetali oltre che in quasi tutti i microrganismi aerobi che hanno la possibilità di farne la sintesi. Questo fattore può agire fino ad una diluizione di 2×10^7 . La necessità da parte degli anaerobi di questo fattore di accrescimento rappresenta una nuova causa della simbiosi fra anaerobi ed aerobi, indipendentemente dal reciproco comportamento rispetto all'ossigeno.

Secondo una interessante osservazione recentemente fatta da Silverman e Werkman sul *Propionibacterium pentosaceum*, i microrganismi potrebbero più o meno lentamente adattarsi ai terreni nutritivi privi di vitamina B₁, nel senso che si allenerebbero alla sintesi della aneurina che inizialmente erano incapaci di formare.

Tutte queste esigenze dei microrganismi rispetto ai fattori di accrescimento richiamano alla nostra mente il cosiddetto Bios di Wildiers sulla cui composizione gli studi di questi ultimi anni ci hanno in parte illuminati. Infatti la biotina, sostanza aminata e solforata riscontrata da Koegl, è capace ancora di agire sul lievito alla diluizione di $1 : 4 \times 10^{11}$. Essa però per esplicare la sua funzione dovrebbe essere accompagnata, secondo Devloo, da un altro fattore: il Biosterolo, che sarebbe sfuggito prima perchè sempre presente in minutissime tracce nello zucchero impiegato per le culture. Ed altre sostanze ancora quali ad es. la leucina, sarebbero contenute nel Bios, tuttavia il modo d'azione di esse non ci è ancora completamente noto. Alcune di tali sostanze sono state anche saggiate rispetto a microrganismi terricoli e si è potuto constatare ad esempio una accelerazione *in vitro* dei processi metabolici del *Rh. radicola*.

Un lato particolarmente interessante offre il Bios al nostro ordine di idee, poichè esso agisce non soltanto sui microrganismi ma anche sullo sviluppo dei vegetali superiori, probabilmente per il suo contenuto in Biotina che — come ha dimostrato il suo scopritore — accelera notevolmente lo sviluppo degli embrioni di pisello sterilmente coltivati. Questa constatazione ci offre il destro di rilevare la funzione che i microrganismi possono esercitare indirettamente sullo sviluppo delle piante attraverso alle sostanze da essi elaborate anche nei riguardi della formazione delle cosiddette *auxine* od ormoni vegetali. Nielsen fu molto probabilmente il primo studioso a constatare la produzione di ormoni utili all'accrescimento delle piante da parte dei mi-

crorganismi. A vero dire, da oltre cinquant'anni sappiamo che i microrganismi possono produrre durante il loro metabolismo l'acido β -indolo-acetico ma non si sapeva allora che questa sostanza esercitasse la funzione di auxina vegetale. In una serie di lavori Koegl ed i suoi collaboratori hanno determinato la costituzione chimica degli ormoni delle piante cui seguì la scoperta della etero-auxina, cioè dell'acido β -indolo-acetico nell'urina. Dopo il lavoro del Nielsen del 1930 molti AA. ebbero occasione di constatare come le auxine fossero largamente elaborate dai microrganismi. Nel 1939 J. L. Roberts ed E. Roberts hanno esaminato 75 terreni indiani, isolando 150 specie di schizomiceti ed ifomiceti che sono stati studiati onde stabilire la loro possibilità di produrre auxine. Essi hanno constatato che il 66 % poteva effettivamente produrre queste sostanze su substrati organici ed il 30 % anche su substrati sintetici. I microrganismi aventi la possibilità di elaborare auxine su mezzi nutritivi minerali appartenevano tutti agli schizomiceti; nessuna muffa ha prodotto infatti auxine in assenza di sostanza organica. Questi AA. suppongono che i microrganismi elaborino l'etero-auxina come risultato finale del catabolismo del triptofano o come prodotto intermedio di questa attività.

Per quanto il numero dei microrganismi esaminato dai due Roberts sia notevole, non si può affermare che tutti i microrganismi abbiano la possibilità di elaborare auxine. Certamente molti di essi sono sensibilissimi alla loro presenza nelle culture, come ha potuto constatare il Ball coltivando l'*Escherichia Coli* in terreni sintetici aggiunti di etero-auxina e lo Zironi, coltivando in usuali terreni nutritivi aggiunti di auxine il B. di Ducrey e attenendone rigogliose culture, quando è noto che questo microrganismo non sviluppa che in presenza di sangue. Operando su microrganismi del terreno e precisamente sull'*Azotobacter chroococcum* ho potuto constatare come la stessa auxina dia luogo non soltanto ad un maggior sviluppo microbico ma anche ad una maggiore quantità di azoto fissato. Questa sensibilità dell'*Azotobacter* alle auxine, potrebbe offrire una spiegazione per analogia, delle esperienze di Allison ed Hoover sulla moltiplicazione del *Rh. radicolica* coltivato su terreni sintetici in presenza di un fattore di accrescimento estratto dall'humus ed ipoteticamente identificato con l'acido umico.

Ad ogni modo, la possibilità che gran parte dei microrganismi del suolo possa elaborare sostanze così importanti per la vita delle piante, ancora attive a diluizioni tanto elevate, dimostra ulteriormente la perfetta armonia che lega vegetali superiori e microrganismi. Indipendentemente infatti dalla importanza che i microrganismi hanno nell'elaborare, trasformare e custodire gli elementi fertilizzanti, cioè le sostanze nutritive dei vegetali, essi sono legati attraverso ai prodotti del loro ricambio coi fenomeni di germogliamento ed accrescimento dei vegetali superiori.

Il suolo è ben lungi quindi dall'essere soltanto sede meccanica per le radici delle piante ma si può affermare che le attività fisiologiche dei vegetali si prolungano oltre le minute terminazioni capillari delle radici e trovano una continuità biochimica nel complessissimo mondo microbico. E si noti ancora come singole specie di piante superiori, per le particolari trasformazioni chimiche e fisiche che determinano intorno alle radici, favoriscano il costituirsi di una microflora specifica che può essere utile o dannosa a seconda

delle esigenze della pianta e dell'equilibrio dei restanti fattori ambientali. Basti ricordare la funzione delle cosiddette batteriorizze, così ampiamente illustrata dal Perotti, e la caratteristica faunola protozoarica rilevata da R. e L. Grandori intorno alle radici di alcune piante ad alto fusto.

Se teniamo presente infine, la probabilità che dai rapporti intimi fra microrganismi e piante superiori possano in taluni casi derivare a queste ultime, delle sensibilizzazioni specifiche od aspecifiche nei riguardi di taluni microrganismi del terreno, sì da dar luogo a delle vere e proprie vaccinazioni o sensibilizzazioni delle piante rispetto a questi, si vede quanto complessa possa essere l'influenza esercitata dalla microflora terricola sopra la vita delle piante superiori. Nè si creda che queste ultime considerazioni costituiscano esclusivamente delle brillanti ipotesi, giacchè una copiosa letteratura, alla quale sono orgoglioso di aver dato il mio contributo, dimostra ormai la possibilità per i tessuti vegetali di reagire, analogamente a quelli animali, all'azione immunizzante, intesa in senso lato, di microrganismi vivi o morti o dei loro prodotti di ricambio. D'altra parte, le ricerche di Leeman circa l'influenza dei prodotti metabolici dei microrganismi del terreno sullo sviluppo delle piante hanno sperimentalmente dimostrato l'esistenza di influenze favorevoli o sfavorevoli sulla loro germinazione e sull'accrescimento a seguito di assorbimento radicale dei prodotti stessi. Considerazioni analoghe si potrebbero trarre dagli interessanti lavori della Scuola di Peyronel sul diverso comportamento delle secrezioni ifomicetiche sulla germinazione dei semi e sullo sviluppo di vegetali, oltre che dalla imponente raccolta di nozioni che ci viene offerta dalla letteratura riguardante quell'interessantissimo esempio di simbiosi che è la micorizza allo studio della quale Peyronel ha dato un contributo fondamentale.

Anche la batteriofagia, fenomeno in certo senso legato ai problemi immunitari, è stata riscontrata nei riguardi dei microrganismi del terreno. Demolon e Dunez in Francia, io e Castellani in Italia, abbiamo messo in rapporto la così detta stanchezza dei medicai con la presenza nelle nodosità di vecchie piante, e nei terreni da lungo tempo sottoposti a tali culture, dello specifico batteriofago del *Rh. radicicola* studiandone anche le condizioni di azione, sviluppo e diffusione.

Mi lusingo che il rapido sguardo dato ad alcuni aspetti della vita microbica del terreno, sia sufficiente a dimostrare quanta utilità possa derivare da un approfondimento delle nostre conoscenze in questo campo di studi, non soltanto come contributo alla biologia vegetale inteso in senso naturalistico, ma come fondamentale indagine necessaria ad ampliare le nostre conoscenze sulle condizioni che regolano la vita dei vegetali coltivati. Gran parte del progresso agrario è legato al razionale sfruttamento delle piante coltivate, razionale sfruttamento che non significa soltanto grossolano aumento di prodotto ma eziandio produzione sana, ricca in elementi nutritivi, armonicamente completa in tutti i suoi fattori vitaminici e, aggiungiamo pure, saporita e fragrante di profumi, quali debbono essere gli alimenti per un popolo in rapido accrescimento e di alacre attività quale è il popolo italiano.

Una tale produzione non può essere conseguenza che di coltivazioni la cui tecnica sia basata soprattutto sul razionale sfruttamento e potenziamento

delle energie naturali del terreno, considerato quindi non come inerte substrato fisico-meccanico entro il quale circolano o sostano "gli indispensabili minerali fertilizzanti, ma come una inscindibile manifestazione vitale che va dal microorganismo, al più eccelso e lussureggiante albero.

Non mi farebbe meraviglia che taluno considerasse questi studi come eccessivamente teorici, non offrendo essi delle sicure ed immediate applicazioni pratiche o magari professionali; di conseguenza non saprei se essi debbano venire classificati fra quelli di scienza pura o fra quelli di scienza applicata. Sono convinto che contrapporre l'una all'altra queste due forme di indagine scientifica, come usa taluno, voglia dire creare una questione assolutamente artificiosa e sminuire il valore della scienza in qualunque modo sia intesa. Lo sforzo di indagare, descrivere e coordinare le leggi dei fenomeni naturali costituisce lo scopo di ogni ricerca scientifica, sia che approfondisca la costituzione dell'atomo, od analizzi i fenomeni che accompagnano la maturazione del letame, indipendentemente dalla immediata o lontana applicazione pratica: applicazione del resto, che può scaturire improvvisamente anche dagli studi concepiti e condotti nel modo più assolutamente teorico. Nessuna attività tecnica e tanto meno l'attività che ha luogo nel vastissimo campo dell'agricoltura e delle industrie ad essa collegate trova possibilità di vero e *continuativo progresso* se non è profondamente permeata di spirito scientifico.

Comunque, scienza pura o scienza applicata che esso sia, questo interessante capitolo delle scienze biologiche che è la Microbiologia del terreno, non può trovare sede più propizia per le sue indagini che nelle nostre Facoltà di Scienze Agrarie ove il complesso problema può venire affrontato dal concorde sforzo dei biologi e chimici del terreno.

Noi abbiamo fede che da questi studi possano derivare conquiste di nuove verità e feconde deduzioni a vantaggio dell'agricoltura.

Miei cari studenti,

Sono trascorsi i tempi nei quali gli studiosi si estraniavano dal mondo, vivendo esclusivamente in più o meno elevate sfere spirituali. Oggidì la vita nazionale con i suoi problemi sociali ed economici è entrata anche nelle aule universitarie. Ve l'hanno portata soprattutto i giovani e non da oggi soltanto ma da quando rompendo lunghe tradizioni e prevenzioni fecero la scuola centro di propaganda e di patriottismo, offrendo poi largo olocausto di sacrificio e di sangue nella grande guerra. Lo spirito rivoluzionario e innovatore di allora rivive oggi in voi; esso deve essere diuturnamente presente nel vostro animo, anche nelle aule e nei laboratori.

Se vi è una categoria di giovani che deve sentire più urgenti ed impetose le necessità riorganizzative messe in risalto dalla rivoluzione fascista, tale categoria è quella degli studenti d'Agraria.

I complessi problemi tecnici, economici e soprattutto sociali connessi alla organizzazione corporativa della produzione ed alla realizzazione di una più larga giustizia sociale, incontrano nel mondo agricolo le maggiori difficoltà di affermazione e l'ambiente più bisognoso di profonda conoscenza psicologica. L'elemento tecnico può rappresentare, nella razionale impostazione dei problemi e nell'avviamento alla loro risoluzione, un fattore di pri-

missima importanza; onde voi potete divenire i collaboratori più preziosi per un'ampia e rapida realizzazione dei postulati della rivoluzione.

Non desti meraviglia che io chiuda la mia prolusione con considerazioni che esulano da un dominio scientifico che può sembrare tanto lontano dalla vita sociale. Impartire l'insegnamento in un ordine di alta responsabilità politica e morale come indica la Carta della Scuola, ritengo significhi anche, per l'insegnante, tendere ad un affiancamento spirituale dei giovani che domani saranno chiamati ad assolvere una preminente azione tecnico-sociale. In tale senso so di potervi essere vicino con l'animo entusiasta, non unicamente per i problemi scientifici e tecnici, ma anche e soprattutto, per quelli della vita.

Voi avrete il grande privilegio, entrando nella vita attiva, di poter contribuire con il vostro ingegno e con il vostro lavoro alla realizzazione di quello che fu il sogno di molte generazioni passate: rendere grande la nostra Patria, non soltanto con il valore delle armi, ma altresì attraverso la elevazione spirituale e materiale di tutti i suoi figli. Siatene degni operando sempre con viva fede, anche a rischio di errare, poichè solamente lottando per un alto ideale con entusiasmo e disinteresse, si è veramente degni di quel divino dono che è la gioventù.

BESTIAME SANO E ROBUSTO

Le normali razioni alimentari
per il bestiame devono essere
in ogni caso integrate con

FOSFATO DI CALCIO PRECIPITATO

il sale minerale che concorre
alla formazione ed all'irrobusti-
mento delle ossa ed, in genere,
a migliorare tutto l'organismo
animale. Gli allevatori di be-
stiami devono richiedere il

FOSFATO DI CALCIO PRECIPITATO

direttamente, prontamente e
totalmente assimilabile, specia-
le preparato della

“MONTECATINI”

SOC. GENERALE PER L'INDUSTRIA MINERARIA E CHIMICA
MILANO, VIA PRINCIPE UMBERTO 18