

# 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

GENNAIO 1941 - XIX  
VOL. I - FASC. III

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-           |
| ettogrammo = hg  | decimetro = dm   | millim quadr = mmq | condo = sec          |
| 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. CaCl<sub>2</sub>.

---

## SOMMARIO

|   |      |     |
|---|------|-----|
| DOMENICO CARBONE  | pag. | 113 |
| C. ANTONIANI - A. CANDIA - T. CASTELLI - Contributi alla conoscenza del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati | »    | 117 |
| T. CASTELLI - A. SIMONI - Ricerche sul Laghbi Tripolino .   | »    | 123 |
| M. MAZZEO - G. MARINELLI - Sull'autodepurazione degli ortaggi   | »    | 139 |
| C. ARNAUDI - E. CORBERI - H. SOARES RODRIGUES - Ricerche microbiologiche sui formaggi molli italiani                | »    | 153 |
| Notiziario e attualità di Laboratorio .   | »    | 175 |

---

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

**BANCA  
COMMERCIALE  
ITALIANA**

**CAPITALE L. 700.000.000**

**RISERVA L. 160.000.000**

**AL 18 MARZO 1940- XVIII**

**BANCA DI INTERESSE NAZIONALE**

# **CREDITO ITALIANO**

BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

S. A. CAPITALE L. *500.000.000*

RISERVA L. *120.418.272*

SEDE SOCIALE: GENOVA

DIREZ. CENTRALE: MILANO

**OGNI OPERAZIONE E  
SERVIZIO DI BANCA**



## **Domenico Carbone**

*Nella Sua abitazione in Milano ha cessato di vivere sabato 7 dicembre 1940-XIX. Domenico Carbone.*

*Il notissimo batteriologo era nato in Milano, il 21 marzo 1880. Discendeva da famiglia piemontese che aveva dato alla Patria uomini illustri quali il patriota e letterato Domenico Carbone (1823-1883), e l'anatomopatologo Tito Carbone (1863-1904).*

*Cresciuto in un ambiente familiare permeato di spirito scientifico, ed educato amorevolmente nella via degli studi biologici dallo zio Tito, Domenico Carbone si laureò in medicina nell'Università di Pisa nel 1904 e due anni dopo in Chimica pura a Pavia. Conseguiva poi la libera docenza in Batteriologia Agraria nel 1911 ed in Igiene nel 1918. Nel 1925 partecipava con esito brillante ad un concorso per cattedra universitaria, ma non abbandonava tuttavia l'Istituto Sieroterapico Milanese dove nel 1919 chiamatovi da Serafino Belfanti, aveva fondato una Sezione per le ricerche di Batteriologia Industriale ed Agraria, e dove continuò la Sua vasta e profonda attività di studioso.*

*Ricercatore appassionato, aveva la mente aperta a tutti i problemi scientifici e specialmente quelli biologici. In quasi tutti i campi ai quali rivolse la Sua attività, lasciò una profonda impronta del Suo modo originale e personale di impostazione sperimentale e di svolgimento tecnico, giacchè amava affrontare ex novo i problemi scientifici, senza subire l'influenza delle opinioni altrui e benchè fosse profondamente colto, riusciva a mantenere la propria mente libera da preconcetti e tendenze dottrinarie.*

*Non è possibile in questo breve cenno biografico ricordare anche soltanto di sfuggita tutti i lavori di Domenico Carbone. La Sua attività di sperimentatore, iniziata nel 1906 con ricerche riguardanti l'origine di alcuni pigmenti microbici e pubblicate nei « Rendiconti del R. Istituto Lombardo di Scienze e Lettere », non conobbe soste. Pochi giorni prima della Sua fine, si dedicava con alacrità a studi sperimentali riguardanti la fermentazione metanica. Le Sue pubblicazioni sperimentali assommano a 118; oltre a 58 pubblicazioni di carattere critico-sintetico e divulgativo.*

*I campi di ricerca affrontati dal Carbone sono assai svariati. Dalla Biochimica (alla quale diede notevoli contributi con lavori sperimentali riguardanti le ossidasi e la tirosinasi) alla Patologia generale, con gli studi sul meccanismo della reazione di Wassermann e quelli sulla composizione del cervello umano in alcune malattie mentali. Dalla Micrografia, alla Biologia dei microrganismi patogeni per l'uomo. Di essi ricorderemo soltanto quelli riguardanti il vibrione colerigeno ed il relativo metodo di diagnosi batteriologica rapida che è stato largamente impiegato durante alcune epidemie e soprattutto, durante la grande guerra.*

*Il campo nel quale Domenico Carbone amò particolarmente esercitare la Sua acutezza di indagatore, riguarda tuttavia la Batteriologia industriale ed agraria dove ha lasciato alcuni lavori veramente fondamentali: oltre agli studi sulla decomposizione dei vegetali ad opera della microflora del terreno, concepiti e condotti trent'anni fa con criteri e visioni anticipatrici degli odierni indirizzi in materia, Egli ha portato un notevole contributo allo studio della macerazione delle piante tessili ad opera dei microrganismi aerobici, collaborando dal 1906 al 1909 con il Prof. Giacomo Rossi a Portici. Più tardi, affrontato il dibattuto problema della macerazione anaerobica delle piante tessili, giungeva alla scoperta dell'agente della macerazione rustica: un bacillo macerante anaerobico cromogeno, cui dava il nome di B. Felsineus.*

*In una numerosa serie di lavori successivi, il Carbone precisava caratteri biochimici del B. Felsineus e la sua diffusione in natura, mettendo a punto un metodo di macerazione industriale basato sul razionale impiego di culture del microrganismo da Lui scoperto. I Suoi studi permettevano così l'industrializzazione di una pratica tradizionalmente agricola diventando il punto di partenza del rinnovamento della linicoltura italiana.*

*Altro campo di studi al quale il Carbone ha dedicato la Sua opera di sperimentatore e soprattutto di incitatore, è quello riguardante l'Immunologia vegetale. Anche questo ordine di studi, molto discusso specialmente all'epoca in cui il Carbone cominciò ad occuparsene (1922), è stato da Lui affrontato con mente spoglia dei non pochi apriorismi favorevoli o contrari, che rendevano ancor più intricato il problema della fitoimmunità. I risultati sperimentali di Carbone e della Sua Scuola hanno arrecato un contributo originale e fondamentale agli studi fitoimmunologici, suscitando nel mondo scientifico (soprattutto straniero) un interessamento che si è concretato con traduzioni di alcune memorie e monografie e con l'invio di studiosi da parte di Enti scientifici stranieri, presso il laboratorio di Carbone all'Istituto Sieroterapico Milanese, per apprendervi i fondamenti tecnici della fitoimmunologia.*

*A molti altri campi della Batteriologia applicata alle fermentazioni industriali, il Carbone ha portato un contributo di studi o di osservazioni e di idee.*

*A fianco della Sua molteplice attività di ricercatore, sviluppò sempre con spontanea passione quella di insegnante. Questa opera didattica, essenzialmente a carattere dimostrativo, ebbe modo di estrinsecarsi soprattutto in favore dei giovani che hanno frequentato il Suo laboratorio, per svolgervi la parte sperimentale di tesi di laurea, oppure per perfezionarsi in Fermentologia. Fra questi ultimi gli erano particolarmente cari i laureati inviati al Suo laboratorio da importanti industrie fermentative che dimostravano in tal modo, di comprendere l'importanza che anche per l'industria chimica ha la Batteriologia tecnologica e di apprezzare al giusto valore la Sua opera di insegnante.*

*Per gli allievi, il Carbone si prodigava con affettuosa premura, infondendo in essi la passione per la ricerca e nel contempo abituandoli ad una severa disciplina critica. Chi scrive ha avuto la fortuna di averlo come Maestro*

*nei primi anni della propria attività di sperimentatore ed è orgoglioso di conservare, con devota gratitudine, l'impronta del Suo insegnamento.*

*Domenico Carbone aveva fatto della Scienza la Sua vita: la Sua Giornata era divisa esclusivamente fra il laboratorio e la famiglia, lavorando in silenzio e con passione sempre rinnovata.*

*L'opera di questo batteriologo insigne è consegnata nella storia della Microbiologia ed il Suo nome sarà ricordato da quanti lo conobbero come esempio di coerente integrità spirituale.*

CARLO ARNAUDI

# Contributi alla conoscenza del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati

C. Antoniani - A. Candia - T. Castelli

(Ricevuto il 15 novembre 1940-XIX)

## NOTA I

Conosciamo assai poco sul chimismo fermentativo dei lieviti apiculati. Il loro potere di fermentazione è in genere poco elevato e per lo più si arresta quando il substrato raggiunge un tenore in alcol del 4-5 per cento in volume. Se la frazione di zucchero che viene fermentata lo sia conformemente agli schemi oggi ammessi per il decorso fermentativo normale non è per altro ancora stabilito. Ignoriamo se la cellula degli apiculati contenga per intero o solo in parte il sistema enzimatico della zimasi, o se a fianco degli enzimi di questo sistema, altri ne siano presenti, capaci di influenzare il decorso normale della fermentazione attraverso una inserzione di processi paralleli o derivati. È noto che i lieviti apiculati sono forti produttori di acidi volatili, e in particolar modo di acido acetico e di acido formico. Ma non è chiarito se questa acidità volatile sia unicamente in relazione al potere di attacco di questi lieviti per gli acidi fissi normalmente contenuti nei mosti, oppure se essa dipenda da una deviazione del processo di demolizione glucidica dopo la fase di formazione dell'aldeide acetica. Se sia cioè imputabile a questi lieviti una particolare tendenza verso quel tipo di fermentazione, che potremmo dire semi-ossidativa, e che il Neuberg ha designato come terza forma di fermentazione.

L'importanza dello studio del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati non è tale soltanto dal punto di vista dottrinario. E' noto in quale misura questi lieviti concorrano a determinare i normali processi di fermentazione del mosto d'uva (1). Si è discusso molto, e si discute tuttora, sulla entità e sui limiti dell'influenza che gli apiculati esercitano sulla vinificazione. Per quanto la questione sia complessa e tale da non potersi inquadrare in rigide norme di valore generale, è noto a questo riguardo come le vecchie opinioni sostenute dal Müller-Thurgau e da altri, e secondo cui i lieviti apiculati agendo in concorrenza col lievito ellittico avrebbero manifestato azione sfavorevole sulla vinificazione, non può più oggi essere condivisa, soprattutto dopo le sistematiche e probatorie esperienze del De Rossi (2). Esclusa una influenza nociva, e poichè è di per sè evidente che un lievito il quale pressochè da solo presiede ai primi stadi, almeno, della fermentazione del mosto d'uva, una influenza comunque sia la deve esercitare, bisogna *a fortiori* ammettere che anche gli apiculati contribuiscano a determinare ciò che siamo soliti indicare come buon andamento della vinificazione

In quale modo? E attraverso la formazione di quali sostanze? E come e in qual misura interferendo e modificando il chimismo che è proprio dei

lieviti ellittici? Questi ed altri ancora, facili ad intuirsi, sono i problemi che si pongono dal punto di vista pratico, ed alla cui soluzione non si potrà soddisfacentemente giungere se non studiando, sia in vivo che in vitro, il comportamento generale sia dei lieviti apiculati che degli ellittici, e, in particolare modo, il comportamento che deriva dalla loro associazione. Ci inse-riamo qui in un argomento di vasta portata generale, quello dello studio delle fermentazioni associate. Argomento ancor troppo scarsamente indagato, se pure per esso si prospettino assai fruttuosi sviluppi nel campo della zimo-chimica.

Le esperienze di cui riferiamo in questa nota, riguardano alcune prove di fermentazione con *Pseudosaccharomyces apiculatus*, un lievito apiculato descritto dal De Rossi (3) e da questi indicato come produttore di quantità considerevoli di acidi volatili. Le prove vennero eseguite allo scopo di inda-gare la natura del processo di genesi di questi acidi, in relazione alle due distinte possibilità, già accennate in precedenza, che per essa si prospettano.

Una parziale deviazione della prima forma di fermentazione di Neu-berg verso la terza, non può logicamente essere esclusa. Le condizioni che si richiedono per il suo manifestarsi, se pure in ridotta misura, si verificano sempre *ad latere* del processo fermentativo normale. E in considerazione di questo fatto si ammette da molti che la piccola frazione di acidi volatili (essenzialmente acido acetico) che si forma nella fermentazione alcolica nor-male, derivi direttamente dallo zucchero per questa via. Conformemente allo schema formulato dal Neuberger per la terza forma di fermentazione, l'acido volatile che così si origina dovrebbe essere accompagnato dalla for-mazione di glicerina. La misura dell'accumulo di questa, e, più ancora, la misura del suo parallelismo con l'accumulo dell'acido, dovrebbero per tanto costituire, in via teorica, un indice diretto dello svolgersi di questo processo. Sta però di fatto che la misura dell'entità con cui la terza forma di fermentazione può partecipare alla fermentazione alcolica normale, urta in diffi-coltà notevoli, insite in buona parte nelle stesse disformità di comportamento dei lieviti, e costituisce, a tutt'oggi, un problema ancora aperto all'indagine.

D'altra parte, il fatto che i lieviti apiculati siano segnalati tra gli attivi demolitori della molecola degli acidi organici del mosto d'uva (4), legittima la supposizione che gli acidi volatili possano formarsi anche come prodotti di questa demolizione. Il Meissner (5) ha constatato che il *Sacch. apiculatus* può trasformare l'acido malico e l'acido tartarico in acido lattico. La succes-siva trasformazione biochimica di quest'ultimo in acido acetico, è nota da tempo per azione batterica (6), e Neuberger e Tier (7) l'hanno dimostrata an-che per lo stesso lievito in vivo. Alcune razze degli stessi lieviti apiculati (8) sono inoltre capaci di demolire ulteriormente l'acido lattico, ed è sen'altro ammissibile che l'acido acetico e l'acido formico compaiano tra i prodotti di questa demolizione. Che questo particolare processo di *fermentazione de-gli acidi organici fissi* del mosto d'uva, costituisca se non l'unica, almeno la principale fonte degli acidi volatili del vino, è assai probabile. Sorge anche qui il problema della sua dimostrazione, ma a questo riguardo ci sembra che alcune considerazioni, che ora esporremo, possano fornire un utile indi-rizzo di indagine.

E' dimostrato che la formazione degli acidi volatili ha luogo principalmente durante la fase della fermentazione principale. Successivamente, secondo i risultati ottenuti dal Lucchetti (9), si avrebbe una graduale diminuzione di questa acidità, per esterificazione o demolizione ulteriore della molecola dell'acido. Fermentazione alcoolica dello zucchero e fermentazione degli acidi organici fissi decorrono cioè parallelamente. Ciò ammesso, è prevedibile tra i due processi una forzata interferenza, *manifestantesi attraverso l'intervento dell'attività carboligasica*.

Chiariamo il concetto. Secondo quanto sappiamo sul chimismo generale delle azioni fermentative, la formazione di acido acetico (o formico) a partire dall'acido tartarico o malico, deve, in modo analogo a quanto avviene per la fermentazione alcolica, passare obbligatoriamente per lo stadio intermedio di formazione dell'aldeide acetica. Nel mosto si vengono quindi a svolgere contemporaneamente due distinti processi fermentativi entrambi passanti per lo stadio obbligato di quest'aldeide. Ma per effetto della diversità di concentrazione e della diversa natura del relativo substrato, oltre che delle diverse specie di attività enzimatiche che essi chiamano in giuoco, questi due processi non possono decorrere cineticamente simultanei. Essi si svolgeranno sfasati l'uno rispetto all'altro, e le due molecole di aldeide acetica, a cui entrambi danno luogo nel corso del loro svolgimento, si formeranno con larga probabilità statistica in momenti distinti. Quando la seconda molecola di aldeide si forma, essa, *in statu nascendi*, si trova di fronte ad un'altra molecola di aldeide preformata e proveniente da altro processo fermentativo, quindi extrafermentativa rispetto alla prima. Si vengono con ciò a determinare, conformemente a quanto è stato dimostrato dal Neuberg, condizioni favorevoli all'intervento dell'attività carboligasica, cioè alla condensazione aciloinica dell'aldeide acetica.

\*\*\*

Partendo da queste considerazioni, ci siamo proposti di indagare se l'eccedenza di acidità volatile che i lieviti apiculati producono in confronto dei lieviti ellittici trovasse riscontro in variazioni qualitative o quantitative tra i prodotti dell'attività carboligasica.

Un primo gruppo di esperienze di fermentazione su mosti d'uva di varia composizione, rispettivamente con *Pseudosacch. apiculatus* e *Sacch. ellipsoideus*, ci hanno condotto a risultati in soddisfacente accordo con la nostra ipotesi. Le fermentazioni in presenza di *Pseudosacch. apiculatus* sono apparse caratterizzate dalla costante presenza di quantità notevoli di acetoina, fatto che viceversa non si nota per le fermentazioni in presenza di *Sacch. ellipsoideus*, nelle quali l'acetoina o manca, o è presente in tracce o comunque in quantità sempre assai inferiori.

La quantità di acetoina riscontrata nelle fermentazioni in presenza di lievito apiculato non è in diretta correlazione col tenore in acidi volatili. Né ciò, del resto, era da attendersi, date le ulteriori possibilità di trasformazione del chetoalcol. Un quadro completo delle correlazioni in tal senso esistenti si potrà avere solo quando l'indagine sarà estesa anche alla determinazione del 2-3 butilenglicol, il che stiamo facendo. Ma già sin d'ora il fatto che le fermentazioni con lieviti apiculati appaiano caratterizzate da un relativo

maggior accumulo di acetoina, sta a dimostrare per questi lieviti un caratteristico comportamento differenziale, di indubbio interesse.

Che il processo di sintesi acetoinica sia in qualche modo collegato alla genesi degli acidi volatili, risulta anche da alcune nostre esperienze di fermentazione in presenza di *Torulopsis pulcherrima*, sulle quali riferiremo prossimamente. Anche qui la formazione di notevoli quantità di acidità volatile è accompagnata da un più sensibile accumulo di acetoina.

#### ESPERIENZE

Vennero utilizzati per le prove di fermentazione tre mosti di uva bianca, contenenti rispettivamente:

|             |          |        |
|-------------|----------|--------|
| mosto N. 1: | zucchero | 16,45% |
|             | acidità  | 0,90%  |
| mosto N. 2: | zucchero | 9,90%  |
|             | acidità  | 1,30%  |
| mosto N. 3: | zucchero | 14,70% |
|             | acidità  | 1,35%  |

Le fermentazioni vennero compiute su mosto previamente sterilizzato per un'ora a 100° in vapore fluente, innestando con uguali quantità di lievito di coltura pura. Dopo avviamento in termostato a 30° C. le fermentazioni si svolsero a temperatura ambiente.

Le analisi vennero eseguite secondo i metodi ufficiali per quanto concerne l'alcool, lo zucchero e l'acidità. L'acetoina venne determinata secondo L. C. E. Kniphorst e C. J. Kruisher (10).

#### RISULTATI ANALITICI

| Prova A<br>Mosto N. 1<br>Durata della fermentazione: 52 giorni | Composizione del liquido fermentato<br>(in grammi per 100 cc.) |              |
|--|--|--------------|
|  | Apiculatus   | Ellipseidous |
| Zucchero . . . . .   | 7,00   | 0,15         |
| Alcool . . . . .   | 4,30   | 7,50         |
| Acidità totale . . . . .                                       | 1,20   | 1,10         |
| Acidità volatile . . . . .                                     | 0,11   | 0,07         |
| Acetoina . . . . .   | 0,030  | tracce       |
| Prova B<br>Mosto N. 1<br>Durata della fermentazione: 24 giorni | Composizione del liquido fermentato<br>(in grammi per 100 cc.) |              |
|  | Apiculatus   | Ellipseidous |
| Zucchero . . . . .   | 7,90   | 0,25         |
| Alcool . . . . .   | 4,00   | 6,90         |
| Acidità totale . . . . .                                       | 1,25   | 1,30         |
| Acidità volatile . . . . .                                     | 0,14   | 0,03         |
| Acetoina . . . . .   | 0,018  | 0,002        |

| Prova C<br>Mosto N. 2<br>Durata della fermentazione: giorni 22 | Composizione del liquido fermentato<br>(in grammi per 100 cc.) |              |
|--|--|--------------|
|  | Apiculatus   | Ellipseidous |
| Zucchero . . . . .   | 1,40   | tracce       |
| Alcool . . . . .   | 4,10   | 4,60         |
| Acidità totale . . . . .                                       | 1,35   | 1,45         |
| Acidità volatile . . . . .                                     | 0,12   | 0,03         |
| Acetoina . . . . .   | 0,009  | assenza      |

| Prova C<br>Mosto N. 3<br>Durata della fermentazione: giorni 14 | Composizione del liquido fermentato<br>(in grammi per 100 cc.) |              |
|--|--|--------------|
|  | Apiculatus   | Ellipseidous |
| Zucchero . . . . .   | 7,90   | 0,90         |
| Alcool . . . . .   | 4,00   | 6,50         |
| Acidità totale . . . . .                                       | 1,25   | n. d.        |
| Acidità volatile . . . . .                                     | 0,14   | 0,04         |
| Acetoina . . . . .   | 0,018  | assenza      |

Istituto di Industrie Agrarie della R. università di Perugia.  
Perugia, 5 novembre 1940-XIX.

#### RIASSUNTO

Gli AA. Comunicano i primi risultati di una serie di indagini sulle correlazioni tra formazione degli acidi volatili e processo di condensazione aciloinica nei lieviti alcolici.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mitteilung der Resultate einer ersten Versuchsreihe der Verff. Über die Wechselbeziehungen zwischen der Bildung flüchtiger Säuren und dem Acyloin-Kondensationsprozess in alkoholischen Hefen.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) *G. De' Rossi* - I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra (Relazione al IV Congresso Internazionale della vigna e del vino - Losanna, 1935).  
*T. Castelli* - I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e nelle zone limitrofe (Nuovi Annali dell'Agricoltura. - A. XIX, 1939).  
*T. Castelli* - Ancora sui lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti Classico (idem).

- (2) *G. De' Rossi* - I lieviti apiculati nella fermentazione vinaria (Le Staz. Sperim. Agricole Italiane - vol. 53, pag. 233, 1920).
- (3) *Idem* (L. c.).
- (4) *I. Schukow* - Citato da *De' Rossi* (L. c.).
- (6) *C. Mazé* - Comptes rendus, 156, 1101; 1913.
- (7) *Bio Z.* 32, 325; 1911.
- (8) *G. De' Rossi* - (L. c.).
- (9) *G. Lucchetti* - Sul rapporto tra sviluppi di apiculati e formazione di acidità volatile nella fermentazione vinaria. (Bollettino della Facoltà Agraria di Pisa - Vol. XVII - Anno 1936 - XV).
- (10) *Handbuch der Lebensmittel* - Chemie - Vol. VII<sup>o</sup> pag. 376
-

## Ricerche sul Laghbi Tripolino

**Prof. Tommaso Castelli** (Dir. inc.)

**Dott. Andrea Simoni** (All. int.)

*(Ricevuto il 1° dicembre 1940-XIX)*

I così detti vini di palma, cioè i prodotti ottenuti dalla fermentazione del succo estratto da diverse specie di palma allo stato di linfa densa e zuccherina, sono molto diffusi nei paesi caldi. Basterà ricordare l'Arrack dell'Asia tropicale e dell'arcipelago della Sonda, il Bourdon della Guinea, il Némò della Costa d'Avorio, il Malafou del Congo. In tutta l'Africa del nord è abbastanza diffuso l'uso del Laghbi del quale si sono interessati vari studiosi. Così del Laghbi prodotto nell'oasi di Laghonat si è occupato Baland (1), di quello che si consuma nell'isola di Djerba Boselli (2), su quello che si produce nelle oasi tripoline hanno indagato Gasperini (3), Martelli (4) e Bachilli (5). Di data abbastanza recente (1936) è il pregevole lavoro di Durand e Berrebbi (6) i quali riferiscono le analisi condotte su 12 campioni di Laghbi provenienti da diverse regioni della Tunisia.

Tutti gli studiosi che si sono interessati del Laghbi riferiscono che esso si deve considerare come un materiale non conservabile, di aspetto più o meno intensamente lattiginoso, di sapore variamente dolciastro, alcoolico-acidulo e alquanto frizzante. La composizione del Laghbi è, come ben si comprende, estremamente variabile non solo se esso è esaminato all'inizio o al termine della fermentazione o se si tratta di materiale preparato da qualche giorno, ma è fortemente mutevole colle diverse modalità usate per il suo ottenimento, con la varietà e l'età della palma dalla quale è stata ricavata la linfa. Purtroppo si può ritenere che un Laghbi considerato come buono, contiene ancora piccole quantità di zucchero, alcool per il 4-5 % e acidi, sia fissi come volatili pressochè in uguali quantità, per un totale del 5-6 %.

Gli agenti della trasformazione del succo di palma in Laghbi vengono ritenuti i blastomiceti (secondo Gasperini un Sacch. Laghbi, un lievito di tipo ellittico del quale però non ha osservato la sporificazione; secondo Durand e Berrebbi un Sacch. laghbi che ha poche affinità con la forma descritta da Gasperini) e alcuni schizomiceti.

Se dal punto di vista chimico le nostre conoscenze sul Laghbi sono ormai ben definite, quelle che riguardano invece la parte microbiologica si debbono ancora considerare molto imperfette.

Per tale ragione potendo uno di noi (1) soggiornare in Tripolitania

---

<sup>1)</sup> L'isolamento degli stipti spetta al Simoni, il resto al Castelli.

per vario tempo, si è creduto opportuno eseguire accurate ricerche microbiologiche sul Laghbi prodotto specialmente nell'oasi di Tripoli. Allo scopo uno di noi si è recato nel Luglio 1939 in Tripolitania ed ha portato con se tutto il materiale necessario per potere eseguire esami microscopici e culture di isolamento e precisamente: vetrini copri e portaoggetti, soluzioni coloranti e balsamo del Canada, 100 scatole di Petri sterili, 10 litri di agar malto posto in comuni fiaschetti di vetro, 150 tubi di agar malto solidificato a becco di clarino, 50 spatole Drigalsky-Neri.

Si ritiene opportuno far precedere alla descrizione del lavoro eseguito qualche notizia sulla produzione del Laghbi e sulle modalità di estrazione della linfa.

Le varietà della Phoenix dactilifera che possono fornire Laghbi sono molte, principalmente vengono destinate a tale produzione quelle che gli arabi chiamano con i nomi di Bokrari, Muftiti, Tabuni, Bajudi, Levusi.

Il succo viene generalmente estratto da piante femmine però si ritiene che il Laghbi derivato da pianta maschio sia molto più forte; tra i campioni prelevati se ne trova uno di palma maschio poichè dovendo essere la pianta abbattuta ne era stata autorizzata l'incisione.

Le modalità di raccolta per la Libia furono fissate una prima volta con Decreto Reale 20 Marzo 1913 che stabiliva quanto segue: l'estrazione del Laghbi non poteva essere praticata che in seguito a regolare permesso, su piante vecchie, malate o di scarso rendimento con esclusione assoluta di piante maschio; che l'operazione non poteva sorpassare la durata di 40 giorni e che per ogni palma incisa si dovevano pagare 40 lire ed era fatto obbligo al proprietario di piantare una palma in sostituzione di quella che per effetto dell'estrazione fosse perita. Con successivo Decreto Governatoriale in data 23 Settembre 1920 si autorizzavano i municipi ad imporre per ogni palma incisa una soprattassa del 50 % sulle lire 40 ed era fatto obbligo di piantare due palme, anzichè una, per palma perita. Siccome per difficoltà di controllo, queste norme non furono mai seguite derivandone gravi perdite di palme, in certi anni (Bengasi 1922) il Governo fu costretto a vietare completamente l'estrazione.

Dal 1920 in poi varie furono le soluzioni consigliate e per tali ragioni il Reggente Bruni nel 1936 ha diramato una circolare con valore di decreto per tutta la colonia, nella quale, ferme restando le disposizioni del Decreto Reale e del Decreto Governatoriale, si poteva concedere al taglio un numero di palme che non oltrepassasse il 4 % per le oasi costiere e il 3 % per le oasi dell'interno. Appositi uffici istituiti presso le prefetture e presso il comando del territorio militare del sud, con succursali nelle singole oasi, fanno bollare le palme che possono essere incise ed il taglio deve essere eseguito soltanto da persone autorizzate a compiere detta operazione. La estrazione che in precedenza era limitata al periodo marzo-novembre è stata ridotta al periodo maggio-agosto. Con dette ultime disposizioni si è riuscito a ridurre la mortalità dal 40 % al 12 % delle palme incise.

È logico che l'operazione dell'estrazione del Laghbi, sia pure riportata entro limiti molto ristretti, riduce la maggiormente redditizia produzione di datteri ed è per tale ragione che nella corrente stagione per l'oasi di Tripoli è stato concesso il permesso di estrazione per 150 palme soltanto.

Com'è stato detto gli operai addetti all'estrazione debbono essere legalmente autorizzati, essi vengono dagli indigeni chiamati Hagiama-Laghbi (Hagiama in arabo vuole indicare barbiere). L'Hagiama che deve essere molto agile, per compiere l'operazione che vien detta Hagima, sale sulla sommità dell'albero portando una specie di roncola munita di lama arcuata ed affilata, elimina le foglie apicali dell'anno precedente isolando in tal maniera il cono gemmario (cuore). Fa quindi un'incisione circolare alla base del cono gemmario a guisa di canale leggermente inclinato da una parte e nella parte più bassa scava un solchetto destinato a raccogliere la linfa all'esterno del fusto ove è appesa un'anfora di terracotta porosa chiamata giarra. Ogni giorno solco e canale vengono approfonditi. La giarra che serve alla raccolta della linfa viene vuotata quand'è piena ma non viene mai lavata, in tal maniera essa risulta sempre ricchissima di microrganismi.

Il Laghbi viene descritto come un liquido opalescente appena estratto e lattiginoso quando è fermentato, il Bachilli ha potuto osservare che se il Laghbi viene estratto di notte, in stagione non molto calda ed adoperando giarre nuove, onde durante il periodo di estrazione non si verifici (come invece costantemente avviene) la fermentazione alcolica, ha aspetto pressochè trasparente, colore giallastro e sapore dolce aromatico molto gradevole, successivamente, verificandosi la fermentazione, diventa dapprima opalescente, indi lattiginoso mentre si forma un abbondante deposito biancastro.

Il commercio del Laghbi, nei centri urbani, è completamente in mano a maltesi ed ebrei che lo prelevano nelle oasi e lo trasportano in città, molto spesso facendovi varie aggiunte per celare l'annacquamento o altre sofisticazioni.

Il Laghbi viene venduto in grossi bicchieri in bettole che hanno per insegna delle frasche di palma incrociate.

\*\*\*

I campioni di Laghbi esaminati sono stati i seguenti:

1. prelevato nell'oasi di Zanzur da palma Birkari;
2. prelevato nell'oasi di Tripoli da palma Tabuni;
3. prelevato nell'oasi di Tripoli da palma Birkari;
4. prelevato nell'oasi di Tripoli da palma maschio.

L'esame microbiologico veniva eseguito all'inizio del processo fermentativo e ripetuto quando il Laghbi si poteva considerare pronto per il consumo.

Ogni volta si procedeva all'allestimento di preparati microscopici che venivano successivamente colorati con liquido di Ziehl molto diluito e alla

preparazione di culture d'isolamento per spandimento su piastre di agar malto <sup>1)</sup>).

La tecnica messa in opera per le culture d'isolamento era la seguente; sulla prima piastra venivano poste 3 - 4 ansate di Laghbi e con una spatola Drigalsky-Neri si spandevano su tutta la superficie dell'agar, indi, senza caricare ulteriormente di materiale la spatola, si passava a spandere sulla superficie dell'agar della seconda piastra e successivamente sulla terza. Le piastre opportunament contrassegnate venivano poste in un speciale cassetta termostatica, trasportate a Tripoli e mantenute in termostato a 30°.

L'isolamento veniva preceduto da un accurato esame macro e microscopico delle piastre. Con numerosi preparati per impressione allestiti sulle prime piastre particolarmente ricche di colonie si aveva un'idea delle forme microbiche che costituivano le singole coloni mettendo questo risultato in paragone con quello ottenuto nei preparati microscopici sul Laghbi, si poteva avere un criterio abbastanza esatto sulla predominanza delle forme microbiche alle quali naturalmente si doveva riportare il fatto fermentativo. Adottando questo criterio, a volte da una piastra si facevano isolamenti da un solo tipo di colonia, tal'altra da due tipi e a volte anche da tre. Le culture pure sono state ottenute su agar di malto allestito a becco di clarino.

Sono state in tal maniera complessivamente ottenute 48 culture di cui 36 di blastomiceti e 12 di schizomiceti che sono state, in laboratorio, sottoposte al lavoro di identificazione.

\*\*\*

Per l'identificazione delle culture blastomicetiche si è seguita la tecnica normalmente usata in laboratorio e che corrisponde, con lievi modificazioni, a quella indicata dalla Stelling-Dekker (7) e dalla Lodder (8). Precisamente i caratteri microscopici sono stati dedotti da culture allestite in mosto d'uva, decotto di malto e agardi malto rispettivamente di 24 ore e tre giorni a 25°.

Anche i caratteri culturali sono stati dedotti da culture su mosto d'uva, decotto di malto e agar di malto. La colonia gigante è stata allestita su gelatina al mosto d'uva e il periodo di osservazione è stato di 60 giorni a 18°. La fluidificazione della gelatina è stata dedotta dalle piastre con colonie giganti e da infissioni, pure in gelatina di mosto, tenute in osservazione per 2 mesi a 18°. La ricerca della sporificazione è stata saggiata su culture allestite in agar malto, agar Gorodkowa, col metodo dei blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa (9). La fermentabilità degli zuccheri è stata ricercata in brodo di carne col 2% dei rispettivi zuccheri sia adoperando il dispositivo Durham come le provette Einhorn. Per il saggio di sviluppo in presenza

---

<sup>1)</sup> Per l'isolamento dei blastomiceti nel Laboratorio viene normalmente usata la gelatina al mosto d'uva; nel caso delle ricerche sul Laghbi, data l'elevata temperatura della località, non era possibile attenersi al detto substrato; è stato pertanto adoperato l'agar di malto che ha corrisposto molto bene per l'isolamento dei blastomiceti come degli schizomiceti che si riscontrano particolarmente abbondanti nel Laghbi pronto per il consumo.

di alcool etilico come per l'assimilazione dei nitrati sono state seguite le indicazioni della Stelling-Dekker.

Infine per ogni cultura isolata è stato determinato il potere fermentativo con le modalità ben fissate dal nostro laboratorio (10) (11).

\*\*\*

Gli esami microscopici condotti sui quattro campioni di Laghbi hanno dimostrato che mentre all'inizio del fatto fermentativo le cellule blastomicetiche sono in assoluta predominanza e detta predominanza si mantiene durante la fermentazione tumultuosa, successivamente le forme schizomicetiche si fanno man mano più numerose da prendere esse il predominio.

L'identificazione delle culture isolate ha dimostrato che esse si debbono riportare a tre diverse specie blastomicetiche e ad una specie di schizomiceti.

La prima forma blastomicetica che descriviamo e che evidentemente giuoca un ruolo predominante nella fermentazione del Laghbi poichè è stata riscontrata presente in tutti i campioni esaminati e ne sono state complessivamente ottenute 31 culture, presenta i seguenti caratteri.

Nelle culture in mosto d'uva e nel decotto di malto dopo 24 ore e 3 giorni a 25° si osservano cellule di forma ovale ellittica, gemmanti, per lo più isolate e delle dimensioni di  $\mu$  4, 8-9, 6x4, 8-7, 2.

Nell'agar di malto dopo 3 giorni a 25° appaiono cellule globose, ovalari, isolate o riunite a gruppetti di 3-4 elementi delle dimensioni di  $\mu$  4, 8-7x3, 6-5.

Nel mosto come nel decotto di malto già dopo 24 ore a 25° si nota intorbidamento e forte produzione di gas, dopo 3 giorni si ha formazione di discreto deposito al fondo.

Nell'agar di malto la patina si presenta mucosa e di colore bianco, invecchiando la cultura la patina si mantiene sempre mucosa mentre il colore diventa bianco grigiastro.

Nelle piastre di gelatina di mosto dopo 5 giorni a 18° si osservano colonie rotonde, lisce, sopraelevate, a margini netti, di colore biancastro non fondenti. L'infissione in gelatina di mosto mantenuta per oltre due mesi a 18° mostra sviluppo a chiodo con testa rilevata e screpolata e scarsa crescita lungo il canale d'innesto. La massa è fortemente fessurata per sviluppo di gas ma non si nota la minima traccia di liquefazione o rammollimento.

La colonia gigante allestita anch'essa in gelatina di mosto dopo due mesi a 18° si presenta rotonda del diametro di cm. 1,5, con ampio cratere centrale poco profondo, di colore bianco. Il fondo del cratere è perfettamente liscio mentre la sommità è fortemente zigrinata e mediante solchi e rilevatezze si va ad i bordi che sono lobati. La gelatina si mantiene normale (v. fig. 1).

La sporificazione, facile su tutti i substrati, è sempre partenogenetica; gli aschi sono per lo più di forma globosa ovalare e contengono da 1 a 4 spore, in prevalenza 2-3, rotonde a parete liscia delle dimensioni di  $\mu$  2, 8-3 (v. fig. 2).

La fermentabilità degli zuccheri è risultata positiva per il glucosio-levulosio-mannosio-galattosio-saccarosio e raffinosisio; negativa per il maltosio e il

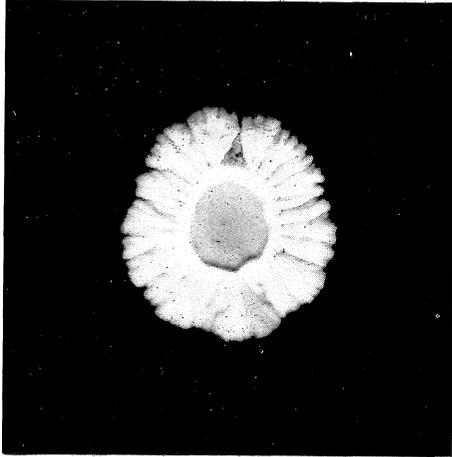


Fig. 1 - *Sacch. laghbi*  
*Colonia gigante su gelatina di*  
*mosto dopo 60 giorni a 18°*  
*(ing. ca 1,5 grand. nat.)*

lattosio. Il saggio di fermentabilità del maltosio è stato più volte ripetuto adoperando maltosio fornito da diverse case ottenendo sempre risultato negativo. A scopo di controllo, due stipti da riportarsi alla medesima specie, sono stati inviati per il saggio della fermentazione del maltosio alla sezione di Delft del Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn. La Dottoressa T. Hof che ha eseguito il saggio ha riscontrato che la fermentazione del maltosio si deve considerare quasi negativa poichè soltanto al settimo giorno si sviluppa una piccola quantità di gas. Anche i risultati per l'assimilazione del maltosio con il metodo auxonografico sono stati negativi. I risultati ottenuti dalla Dottoressa Hof credo non diversifichino da quelli avuti da noi. Riteniamo infatti che la piccola quantità di gas che la Dottoressa Hof dichiara di aver

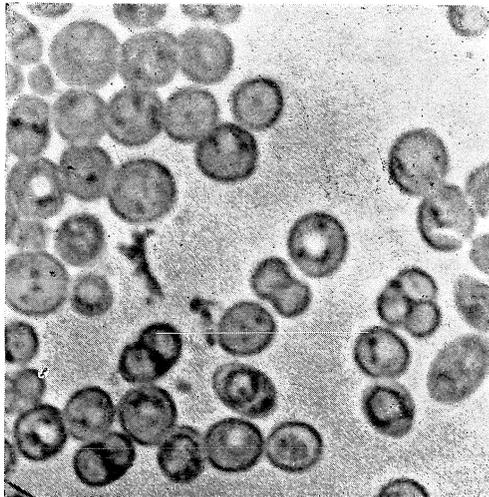
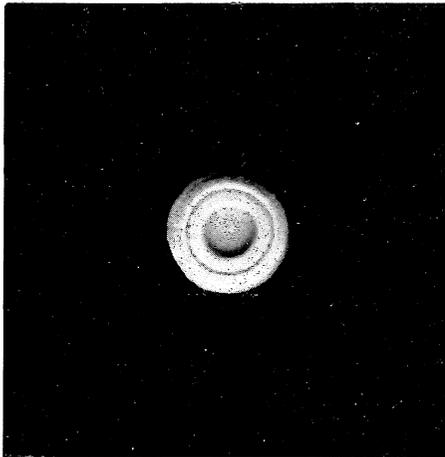


Fig. 2 - *Sacch. laghbi*. *Cultura*  
*sporificata (ing. ca 2000)*

Fig.3 - *Schizosacch. Pombe*  
Colonia gigante su gelatina di  
mosto dopo 60 giorni a 18°  
(ing. ca 1,5 grand. nat.)



osservato al settimo giorno, può, con ogni probabilità, essere provocata dalla ripetuta agitazione dei tubi e trattarsi quindi di aria. D'altra parte un'altra ragione che giustifica la presenza di una piccola e molto tardiva produzione di gas può spiegarsi col fatto già più volte messo in evidenza in laboratorio ed esaurientemente reso noto da Giovannozzi (12). Questi ha osservato che quando si adopera quale mezzo di cultura, per il saggio della fermentabilità degli zuccheri, l'acqua di lievito i risultati non sono certamente probatori in quanto che nella sola acqua di lievito, senza ulteriori aggiunte di zucchero, si può avere una piccola e tardiva produzione di gas. Che il gas prodotto derivi da complessi zuccherini o da altri costituenti dell'acqua di lievito, ciò poco importa, interessa però notare che i risultati ottenuti adoperando l'acqua di

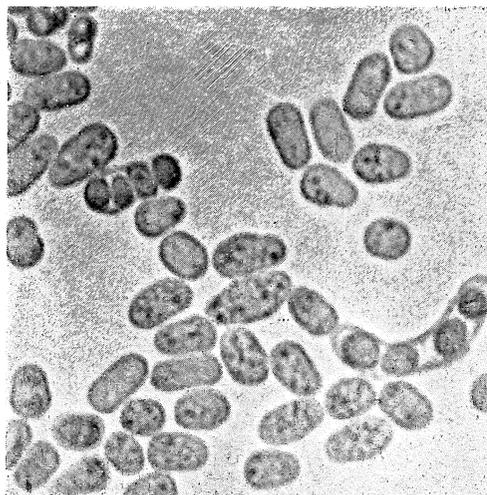


Fig. 4 - *Schizosacch. Pombe*.  
Cultura sporificata. Si osserva-  
no cellule, aschi partenogene-  
tici ed aschi derivati da fatt.  
di coniugazione (ing. ca 2000)

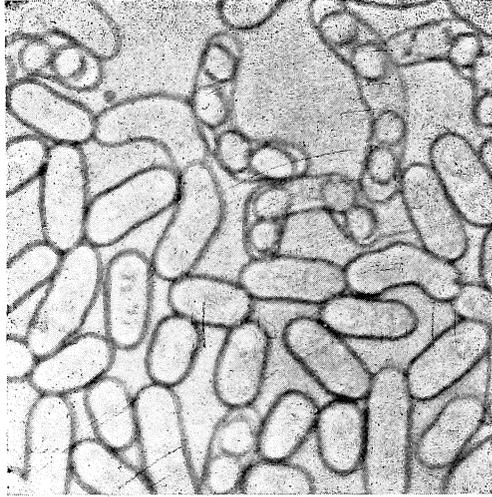


Fig. 5 - *Schizosacch. Pombe*  
Cultura sporificata. Si osserva-  
no cellule, cellule in coniuga-  
zione ed aschi con tipica forma  
a manubrio (ing. ca 2000)

lievito sono fortemente malsicuri. Riteniamo pertanto che la forma in questione non sia capace di fermentare il maltosio.

Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è stato abbondante mentre l'assimilazione dei nitrati è risultata negativa. Il potere fermentativo è abbastanza elevato. Il valore minimo è stato riscontrato nello stipite 10 con una produzione di alcool, espressa in peso del 6,20 % (7,81% in volume), quello massimo nello stipite 18 con 8,88 % in peso (11,18 % in volume).

Per la forma delle cellule, per il modo di produzione degli aschi e per la forma delle spore, lo stipite descritto rientra evidentemente nel genere *Saccharomyces*; in quanto ai caratteri fermentativi la cultura può essere posta nel

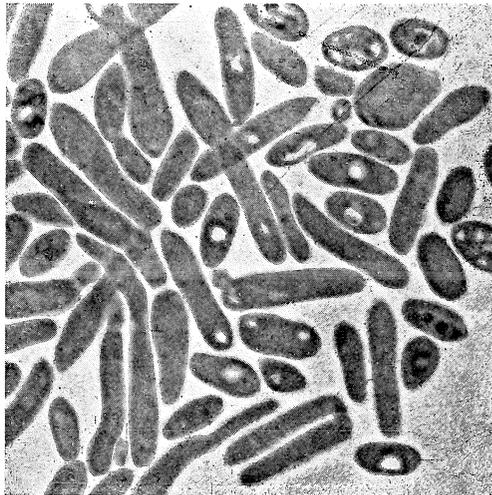
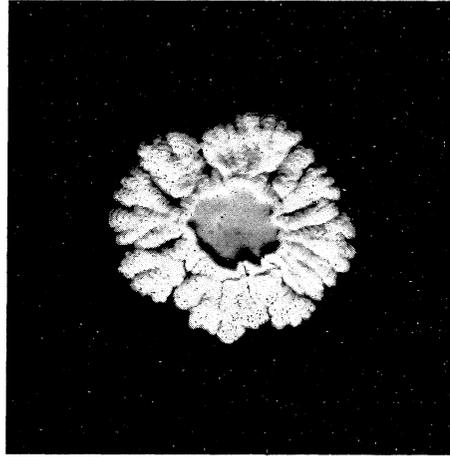


Fig. 6 - *Sacch. carlsbergensis*  
*var. monacensis*. Cellule.  
(ing. ca 2000)

Fig. 7 - *Sacch. carlsbergensis* var. *monacensis*. Colonia gigante su gelatina di mosto dopo 60 giorni a 18° (ing. ca. 1,5 grand. nat.).



secondo gruppo della classificazione di Hansen del genere *Saccharomyces*, dei lieviti cioè capaci di fermentare il glucosio e il saccarosio ma non il maltosio ed il lattosio. A detto gruppo, secondo la Stelling-Dekker, oggi si riportano il *Sacch. exiguus* Hansen, il *Sacch. Mangini* Guilliermond e il *Sacch. Mangini* var. *tetrasporus* (Beij) Dekker. Se diversità morfologiche abbastanza notevoli esistono tra le specie soprannominate e la forma descritta si nota anche una differenza nei caratteri biochimici; infatti mentre il nostro stipite è capace di fermentare il raffinosiso completamente, le specie surricordate lo fermentano soltanto per 1/3. La forma in questione presenta invece analogie fortissime, e riteniamo pertanto che debba essere considerata identica, alla specie descritta

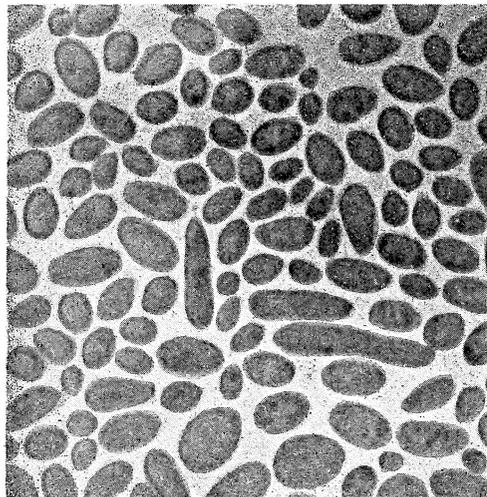


Fig. 8 - *Sacch. carlsbergensis* var. *valdensis*. Cellule.  
(ing. ca 2000)

come il Sacch. Laghbi da Durand e Berrebbi che i detti autori hanno costantemente riscontrato in 12 campioni di Laghbi della Tunisia.

Riteniamo pertanto utile riportarne un'esauriente diagnosi.

*Sacch laghbi* Durand e Berrebbi.

cellule che nelle giovani culture su mosto e su malto si presentano tondeggianti, riunite in gruppetti di 2-3 elementi delle dimensioni medie di  $\mu$  4,8-9,6  $\times$  4,8-7,2. In agar di malto le cellule si presentano isolate, pure tondeggianti, più piccole e cioè di  $\mu$  4,8-6  $\times$  3,6-4,8. Sia in mosto come nel malto si ha fermentazione e deposito al fondo. Nelle culture per striscio su agar di malto si producono patine bianco grigie mucose. La sporificazione è facile e rapida, gli aschi sono partenogenetici e contengono da 1 a 4 spore, generalmente 2-3, di forma rotonda a parete liscia e delle dimensioni di  $\mu$  2,8-3. Fermentazione del glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio e raffiniosio. Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è abbondante. L'assimilazione dei nitrati è negativa e negativa è la fluidificazione della gelatina. La produzione di alcool va dal 6,20 % all'8,88 % in peso (7,81-11,18 % in volume).

La forma che ora descriviamo è stata isolata da un campione di Laghbi prelevato nella vaschetta di raccolta di palma maschio nell'oasi di Tripoli.

Nelle culture in mosto d'uva e nell'infuso di malto dopo 24 ore a 25° si osservano cellule allungate che si riproducono per scissione, delle dimensioni di  $\mu$  5-15  $\times$  2,6-3,8. Anche nell'agar di malto si osservano cellule cilindrico-allungate di  $\mu$  4,8-10  $\times$  2,4-3,6. Nel mosto come nel malto si ha fermentazione, deposito al fondo e nelle vecchie culture traccia di anello. Negli strisci su agar di malto si ha produzione di patina molto abbondante, rilevata, dapprima di colore bianchissimo e successivamente giallognola. La colonia in gelatina di mosto dopo 5 giorni a 18° si presenta rotonda sopraelevata, liscia a bordi interi di colore bianchissimo, non fondente. L'infissione in gelatina di mosto dopo 2 mesi a 18° mostra sviluppo a chiodo con testa rilevata di colore bianco; la massa della gelatina è fortemente fessurata per produzione di gas ma non si nota traccia di fluidificazione. La colonia gigante, anch'essa in gelatina di mosto, dopo 2 mesi a 18° si presenta rotonda con diametro di circa un centimetro, di colore giallognolo. La colonia presenta due zone concentriche, di cui l'interna più bassa; in centro si ha un cratere abbastanza profondo. I bordi della colonia sono interi e tutto il resto è liscio. La gelatina è normale (vedi fig. 3).

La sporificazione è facile sui substrati solidi. La formazione degli aschi è generalmente preceduta da fatti di coniugazione isogamica, gli aschi presentano spesso una caratteristica forma a manubrio. Le spore sempre in numero di 4 per asco, sono di forma ovalare, hanno parete liscia e dimensioni di  $\mu$  3,5 (v. fig. 4-5). I saggi di fermentazione hanno dimostrato che il germe è capace di produrre gas da : glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio, maltosio e raffiniosio per 1/3. Manca la capacità a fermentare galattosio e lattosio. Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è scarsissimo e l'assimilazione dei nitrati negativa. La produzione di alcool è abbastanza elevata raggiungendo il 10,76 %

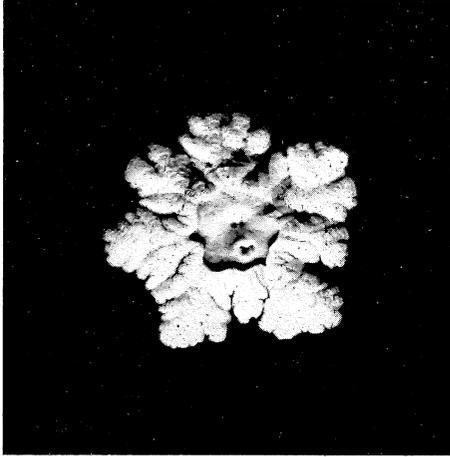


Fig. 9 - *Sacch. carlsbergensis* var. *valdensis*.  
Colonia gigante su gelatina di mosto dopo 60  
giorni a 18° (ing. ca. 1,5 grand. nat.).

in peso (13,55% in volume). A questo riguardo occorre notare che il potere fermentativo è fortemente influenzato dalla temperatura; così mentre a 16° la produzione di alcool è lenta e scarsa, a 30°, che si può ritenere l'ottimo, essa è rapida e forte.

Lo stipite in parola, per la forma delle cellule e la maniera di riproduzione rientra evidentemente nel genere *Schizosaccharomyces* e per tutti i caratteri è da considerarsi identico alla specie isolata da Lindner e descritta come *Schizosaccharomyces Pombe*. D'altra parte lo stipite descritto è stato studiato parallelamente ad una cultura di *Schizosacch. Pombe* avuta dal laboratorio di Delft, dal lavoro eseguito è risultato che nessuna sensibile differenza si poteva rilevare tra la due forme.

Riteniamo opportuno riportarne una breve diagnosi.

*Schizosaccharomyce Pombe. Lindner.*

cellule allungate, cilindriche, spesso riunite in catene di diversi elementi delle dimensioni di  $\mu$  5-15  $\times$  2,6-3,8. Nel mosto come nel malto fermentazione, deposito al fondo e nelle vecchie culture traccia di anello. La formazione degli aschi può essere partenogenetica ma per lo più è preceduta da copulazione isogamica. Le spore sono ovali, a pareti lisce, in numero di 4 per asco, delle dimensioni di  $\mu$  3,5. Fermentazione del glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio, maltosio e raffinosisio per 1/3. Scarsissimo sviluppo in presenza di alcool etilico e negativa assimilazione dei nitrati. La fluidificazione della gelatina è negativa. Le patine di vecchie culture allestite su agar di malto si presentano mucose, lisce e di colore giallognolo. Produzione di alcool 10,76% in peso (13,55% in volume).

Lo stipite seguente è stato isolato dal *Laghbi* contenuto nella giarra di

un commerciante. Il *Laghbi* era stato estratto da palma Bikrari nell'oasi di Tripoli. Nelle culture in mosto d'uva e in decotto di malto dopo 24 ore a 25° si osservano cellule generalmente di forma allungata, isolate o riunite a due, gemmanti delle dimensioni medie di  $\mu$  9,6-12-15  $\times$  4,5-7 (v. fig. 6). Nell'agar di malto dopo 3 giorni a 25° le cellule sono isolate o riunite a due, di forma allungata delle dimensioni di  $\mu$  9,6-12  $\times$  4,8-6.

Nel mosto come nel malto si ha intorbidamento indi fermentazione attiva, deposito al fondo e successivamente anello superficiale di colore biancastro. La patina su agar di malto si presenta mucosa, dapprima di colore biancastro e successivamente bianco grigio. La colonia in gelatina di mosto dopo 5 giorni a 18° è piuttosto allungata, gibbosa, a margini netti e di colore bianco, non fondente. L'infissione in gelatina di mosto dopo 2 mesi a 18° mostra sviluppo a chiodo con testa screpolata, la massa della gelatina è fessurata in seguito a sviluppo di gas ma non si nota traccia di fluidificazione o rammollimento. La colonia gigante, anch'essa in gelatina di mosto, dopo due mesi a 18° è rotonda del diametro di cm. 1,5. Si ha formazione di un cratere centrale non troppo incavato con fondo liscio e di colore giallastro. Dalla sommità del cratere si va ad i bordi che sono abbastanza lobati, per una serie di zigrinature. Ad eccezione del fondo del cratere che, come si è detto, è di colore giallastro, il resto della colonia è di colore bianco. La gelatina si presenta normale (v. fig. 7). La sporificazione è difficile e tardiva sui terreni agarizzati; sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa dopo 8 giorni a 25° si osservano aschi partenogetici di forma per lo più allungata, raramente equilatera, contenenti generalmente 2-3 spore, molto raramente una sola. Le spore sono rotonde e a parete liscia. Lo stipte fermenta attivamente glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio e raffinosiso completamente.

Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è abbondante; l'assimilazione dei nitrati negativa. Il potere fermentativo è piuttosto elevato, la produzione di alcool in peso è dell'11,80 % (14,86 % in volume).

La forma descritta rientra evidentemente nel genere *Saccharomyces* e per i suoi caratteri microscopici, culturali e biochimici si identifica colla varietà *monacensis* del *Sacch. carlsbergensis* della quale si riporta una breve diagnosi.

*Sacch. carlsbergensis* var. *monacensis* (Hansen) Dekker.

cellule ovali ma per lo più allungate, isolate o riunite a due di  $\mu$  9-12-15  $\times$  4,5-7. Nei substrati liquidi contenenti zucchero si ha fermentazione, deposito al fondo e anello superficiale. Sporificazione non troppo rapida nei terreni agarizzati. Aschi partenogetici contenenti generalmente 2-3 spore rotonde a parete liscia delle dimensioni di  $\mu$  3. Fermentazione del glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio e completa del raffinosiso. Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è abbondante; l'assimilazione dei nitrati negativa. Non fluidifica la gelatina. La patina su vecchie culture in agar di malto è mucosa e di colore bianco grigio. La produzione di alcool è dell'11,80 % in peso (14,86 % in volume).

Dallo stesso materiale ove è stato riscontrato lo stipite precedente è stata isolata la forma seguente.

Nelle culture di 24 ore a 25° allestite su mosto d'uva e su decotto di malto si osservano cellule ovalari o leggermente allungate, isolate o riunite a due, gemmanti, delle dimensioni di  $\mu$  8-12  $\times$  5-7 (v. fig. 8). Nell'agar di malto dopo tre giorni a 25° le cellule si presentano isolate o riunite a due, tondeggianti di  $\mu$  4,2-8,4  $\times$  4,8-6, o di forma allungata di  $\mu$  12-16  $\times$  2,4-3,6. Nel mosto come nel malto si osserva prima intorbidamento, indi deposito e tardivamente anello bianco grigio. Nell'agar di malto la patina è abbondante, mucosa, dapprima di colore bianco e successivamente bianco giallognolo.

La colonia in gelatina di mosto dopo cinque giorni a 18° è rotonda, rilevata, a superficie liscia, di colore bianco latteo. Nell'infissione in gelatina di mosto dopo 2 mesi a 18° si ha produzione di chiodo con testa fortemente screpolata. La massa è fessurata per sviluppo di gas ma non si osserva traccia di fluidificazione o rammollimento. La colonia gigante, anch'essa in gelatina di mosto, dopo due mesi a 18° è di forma quasi stellare delle dimensioni di cm. 1,6-1,8, di colore bianco giallastro. Si ha un cratere centrale non troppo profondo e a superficie variamente bollosa. Dalla sommità del cratere si va verso i bordi che si presentano fortemente lobati, con una serie di fittissime zigrinature che conferiscono alla colonia un aspetto fortemente caratteristico. la gelatina è normale (v. fig. 9).

La sporificazione è piuttosto tardiva in agar Gorodkova, sui blocchetti di gesso e sulla silice gelatinosa a 25° la produzione degli aschi si manifesta dopo 7-8 giorni. Gli aschi sono partenogenetici, di forma allungata e contengono soltanto due spore a parete liscia delle dimensioni di  $\mu$  2,6-2,8. La fermentazione degli zuccheri è risultata positiva per il glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio e completa per il raffiniosio. Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è abbondante mentre l'assimilazione dei nitrati è negativa. Il potere fermentativo è alquanto elevato; la produzione di alcool, in peso, è stata del 12,12 % (15,27 % in volume).

La forma descritta rientra evidentemente nel genere *Saccharomyces* e non diversifica sostanzialmente dallo stipite descritto precedentemente, si ritiene pertanto che possa identificarsi con la varietà *valdensis* del *Sacch. carlsbergensis*, della quale si riporta una breve diagnosi.

*Sacch. carlsbergensis* var. *valdensis* (Osterwalder) Dekker.

cellule ovali, ellittiche di  $\mu$  9-12  $\times$  5-7 o strette allungate, isolate o riunite a due, gemmanti. Nei substrati liquidi zuccherini si ha fermentazione attiva, deposito e anello superficiale bianco grigio. Sporificazione piuttosto tardiva. Aschi partenogenetici, di forma allungata, contenenti 2 spore rotonde a parete liscia delle dimensioni di  $\mu$  2,6-2,8. Fermentazione del glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio e completa del raffiniosio. Lo sviluppo in presenza di alcool etilico è abbondante; l'assimilazione dei nitrati negativa. Non fluidifica la gelatina. La patina su agar malto è abbondante,

mucosa, dapprima di colore bianco e successivamente bianco giallastro. La produzione di alcool è del 12,12 % in peso (15,27 % in volume).

Lo studio delle culture schizomicetiche isolate ha dimostrato che si debbono riportare tutte ad una medesima forma che crediamo si possa identificare con la specie descritta da Hansen come *Bacterium aceti* e della quale viene riportata una breve diagnosi.

cellule allungate, isolate o riunite in brevi catene delle dimensioni di  $\mu$ .  $1,2 \times 0,6-0,8$ ; immobili, non sporigene, gramnegative. Le colonie su gelatina di mosto si presentano molto piccole, schiacciate, rotonde e di colore grigio. In vino diluito come in mosto d'uva dà luogo a produzione di una sottile membrana superficiale mucosa di colore grigio scuro. In agar di malto si hanno patine sottili, delicate, mucose di colore grigio giallognolo. Produce acidi dal glucosio. Aerobio, obbligato. Ottimo di temperatura  $30^{\circ}-35^{\circ}$ .

Nel sottostante specchietto si riassumono i risultati delle ricerche eseguite; nella prima colonna viene riportata la provenienza del campione di *Laghbi* mentre nelle altre sono indicate le specie isolate con l'espressione di frequenza riscontrata in ogni campione.

L'esame dello specchietto è di una interpretazione estremamente sem-

| Campione di Laghbi            | Sacch. laghbi | Sacch. carl var. monac | Sacch. carl var. valden | Schizosacch Pombe | Bacterium aceti |
|-------------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------|
| Oasi di Zanzur palma Bihri    | 8             |                        |                         |                   | 6               |
| Oasi di Tripoli palma Tabuni  | 10            |                        |                         |                   | 2               |
| Oasi di Tripoli palma Bihri   | 4             | 2                      | 1                       |                   | 2               |
| Oasi di Tripoli palma maschio | 9             |                        |                         | 2                 | 2               |

plice: esso ci dimostra chiaramente che la specie costantemente presente e in grande predominanza è il *Sacch. laghbi*. In due dei campioni di *Laghbi* esaminati, infatti non è stata riscontrata, tra i blastomiceti, che detta specie. Negli altri due campioni accanto al *Sacch. laghbi* sono state poste in evidenza, sia pure con frequenza scarsissima, altri blastomiceti e precisamente in un campione sono state trovate due varietà del *Sacch. carlsbergensis* e nell'altro lo *Schizosacch. Pombe*.

Infine in ogni campione di *Laghbi*, esaminato quando la bevanda era pronta per fuso, è stata isolata una forma batterica da riportarsi, con ogni probabilità, alla specie descritta da Hansen come *Bacterium aceti*.

Si conclude pertanto che gli agenti della trasformazione del succo di alcune varietà di *Phoenix dactilifera* in *Laghbi*, nella zona di Tripoli, sono da riportarsi ai blastomiceti e agli schizomiceti; tra i primi la specie predomi-

nante e forse l'unica responsabile del processo è il *Sacch. laghbi*, tra i secondi il *Bact. aceti*.

Le dette ricerche confermano, in gran parte, i risultati ottenuti da Durand e Berrebbi nell'analisi di diversi campioni di *Laghbi* della Tunisia.

Era nostra intenzione curare anche la parte chimica del lavoro specialmente confrontando i caratteri del *Laghbi* normalmente ottenuto da quello che si poteva avere raccogliendo il succo con particolari cautele, usando giarre nuove, e inoculando il materiale colle culture da noi isolate. Le attuali contingenze ci hanno, per il momento, impedito detta ricerca.

### CONCLUSIONI

1. Sono stati presi in esame quattro campioni di *Laghbi* provenienti dalle oasi di Zanzur e Tripoli da varietà di *Phoenix dactilifera*: Tabuni, Birkari e palma maschio. Su tali campioni sono state condotte ricerche microscopiche e culturali, all'inizio e al termine della fermentazione, allo scopo di stabilire la natura della flora microbica.

2. L'analisi microbiologica ha dimostrato che all'inizio della fermentazione la flora microbica è costituita esclusivamente da blastomiceti, verso la fine del processo fermentativo compaiono gli schizomiceti che si rinvennero particolarmente numerosi nella bevanda pronta per l'uso.

3. Sono state isolate tre specie di blastomiceti da riportarsi rispettivamente al *Sacch. laghbi*, allo *Schizosacch. Pombe* e alle varietà *monacensis* e *voldensis* del *Sacch. carlsbergensis*.

4. Gli schizomiceti appartengono tutti alla specie *Bact. aceti*.

5. Tra le forme blastomicetiche quella che è stata riscontrata con assoluta predominanza è il *Sacch. Laghbi* che deve pertanto ritenere l'agente principale della fermentazione del *Laghbi* stesso.

### RIASSUNTO

Sono state condotte ricerche microbiologiche su quattro campioni di *Laghbi* (vino di palma) prelevati nelle oasi di Zanzur e Tripoli. Viene dimostrato che gli agenti della trasformazione della linfa in *Laghbi* si debbono considerare i blastomiceti come gli schizomiceti. Tra i primi la forma isolata con assoluta predominanza e che deve forse ritenere l'unica responsabile del processo fermentativo è il *Sacch. laghbi* Durand e Berrebbi, tra i secondi il *Bacterium aceti* Hansen.

### ZUSAMMENFASSUNG

An vier, in der Oase von Zanzur und Tripoli gesammelten *Laghbi*proben (Palmenwein) wurden mikrobiologische Untersuchungen angestellt. Es gelang den Nachweis zu erbringen, dass die Umwandlung der Lymphe in

*Laghbi* sowohl von Blastomyceten als von Schizomyceten bewerkstelligt wird. Unter ersteren ist die am häufigsten isolierte Form, der *Saccharomycet langhbi* von Durand Berrebbi, vielleicht allein für den Gärungsprozess verantwortlich; unter letzteren ist es das *Bacterium aceti* von Hansen.

#### BIBLIOGRAFIA

(1) *Balland* - Sur le vin de palmier récolté a Laghonat. « Jour. de Pharm. et de Chim. », XXX, 79, 461.

(2) *Boselli* - Premières recherches sur la fermentation du vin de palmier. « Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunisi », 1907, III.

(3) *Gasperini* - Il Leghbi o vino di palma. « Nuov. Gior. Bot. », 1888, XX.

(4) *Martelli* - Sulla composizione chimica del vino di palma. - Studi e ricerche del Lab. di Chim. Agraria, Pisa. 14, 93, 1897.

(5) *Bachilli* - Studi e ricerche sul vino di palma (laghbi) dell'oasi di Tripoli. - R. Lab. Chim. della San. Pubbl., Tripoli, 1915.

(6) *Durand e Berrebbi* - Étude sur la fermentation du vin de dattier ou Lagmi. « Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunisi », nov. 1936, 3-4.

(7) *Stelling-Dekker* - Die Sporogenen Hefen « Uitgave De Koninklijke Akad Van Wetenschappen Te Amsterdam », 1931.

(8) *Lodder* - Die Anaskosporogenen Hefen. « N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij », Amsterdam, 1934.

(9) *Castelli* - L'uso della silice gelatinosa per lo studio della sporificazione dei blastomiceti. « Boll. Ist. Sierot. Milanese », 10, 1935.

(10) *De' Rossi* - I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra. - Rel. al IV Congr. Int. della vigna e del vino - Lausanne, 1935.

(11) *Castelli* - I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe. « Nuovi Annali dell'Agricoltura », XIX, 1939.

(12) *Giovannozzi* - Studi sulla fermentazione del tabacco. - 4ª nota. Bollettino tecnico N, 1, 1939.

## Sull'autodepurazione degli ortaggi

**Prof. Mario Mazzeo** (Direttore)

**Prof. Giuseppe Marinelli** (Aiuto)

*(Ricevuto il 5 dicembre 1940-XIX)*

La possibilità che le verdure, specie quelle che si consumano abitualmente crude, possano ospitare germi di malattie infettive, è generalmente ammessa dagli igienisti; i quali, fra i veicoli delle infezioni intestinali, non mancano di annoverare gli ortaggi.

Ma, se si volesse scervere in base a quali dati sperimentali o statistici tale convinzione è venuta formandosi, si rimarrebbe molto perplessi di fronte alla scarsità ed alla contraddittorietà degli elementi di giudizio.

Non staremo qui a fare la storia e la critica delle numerose osservazioni pro e contro la possibilità di cui sopra: si può soltanto accennare al fatto che vi sono studiosi che negano ogni possibilità di un inquinamento infettante massivo e duraturo degli ortaggi, facendo assegnamento sugli sfavorevoli fattori che agirebbero concomitantemente sui germi patogeni (luce, disseccamento, asportazione meccanica per piogge ed inaffiamento, concorrenza vitale, batteriofagi, ecc.); altri che ammettono la possibilità di un inquinamento durevole delle parti più esterne delle piante, facilmente eliminabile con la mondatura ed il lavaggio sufficientemente prolungato; altri, infine, che ritengono che i germi possano penetrare profondamente nella compagine del vegetale, anche se non sono dei fitopatogeni, e permanervi un tempo anche molto lungo: nessuna forma di pulizia e disinfezione — tranne la cottura — sarebbe capace, in questo caso, di bonificare l'ortaggio.

L'ottimismo dei primi è da ritenersi senza dubbio, oltre che pericoloso, infondato: un inquinamento anche massivo delle verdure può verificarsi anche immediatamente prima del loro invio al mercato, e — se pure in misura più limitata — al mercato stesso; d'altra parte i fattori naturali di depurazione non sempre agiscono nelle stesse condizioni, e quindi con la medesima intensità: sarebbero poi del tutto o quasi inefficaci nel caso di penetrazione dei germi nella compagine del vegetale.

Ammessa dunque come possibile una contaminazione degli ortaggi da parte di germi infettanti, quali probabilità vi sono perchè essa si propaghi nella compagine di essi; e quali difese può il vegetale apporvi? La questione è stata ampiamente discussa, con contributi di notissimi studiosi, fra i quali molti italiani. Abbastanza recentemente, poi, Savulescu (1), in una vasta rassegna sulla immunità delle piante alle malattie batteriche, ha preso in esame anche la maggior parte dei lavori eseguiti in proposito; sicchè noi ci

limiteremo a dare uno sguardo panoramico alla questione, con qualche accenno particolare alle più recenti ricerche, od a quelle sfuggite all'autore romeno.

Che i germi capitati sulle piante possano, indipendentemente dalla loro possibilità di nuocere ai tessuti della pianta stessa, penetrare nell'interno di essi pare cosa da non mettersi più in dubbio. Anche del tutto recentemente lavori compiuti in questo Istituto (2) hanno permesso di confermare simile possibilità. I germi fitopatogeni possono penetrare nelle piante attraverso i tessuti integri, oppure ledendo con le loro azioni biochimiche detti tessuti. Il primo modo di penetrazione è stato molto bene studiato da Kunkel (3), a proposito della penetrazione del *Plasmadiophora brassicae* nel tessuto dei cavoli: si credeva che tale invasione potesse aver luogo esclusivamente attraverso i peli assorbenti, ma K. ha visto che il parassita può penetrare da un punto qualsiasi delle radici; e, dopo di aver traversata la corteccia, raggiunge il *cambium* che invade in tutte le direzioni: di là si propaga da una parte nella corteccia, che esso invade così secondariamente, e nei fascetti legnosi e i raggi midollari.

L'altra forma di invasione è caratteristica specialmente dei funghi. Young (4) ha visto che all'attacco di alcuni funghi le piantine di grano reagiscono con un ispessimento della membrana che imprigiona l'ifa di penetrazione, e che si chiama callosità. Spesso le callosità si accrescono più rapidamente che le ife da esse racchiuse, e continuano così ad imprigionarle; ma talvolta le ife di penetrazione si spingono fuori delle callosità e riescono a traversare da una a tre cellule dell'ospite; in questi casi la reazione della membrana cellulare è impotente ad arginare la infezione.

Una volta che il germe fitopatogeno sia penetrato, la sua progressione nei tessuti del vegetale ospitante si effettua con meccanismi probabilmente diversi, e che sono oggetto, anche per uno stesso germe, di discussioni controverse. Ci si può riferire, come esempio caratteristico, a quanto è stato scritto circa l'azione patogena del *B. tumefaciens*. Secondo Smith (5), il parassita resterebbe nell'interno delle cellule, e la sua migrazione deriverebbe dalla divisione e proliferazione delle cellule invase. Per Riker (6), invece, il batterio si sposterebbe per mobilità propria nel liquido che invade gli spazi intercellulari dopo la inoculazione; ed infine, per Robinson e Walkden (7), i batteri progredirebbero lungo gli spazi intercellulari sotto forma di zooglee. Ben Hill (8) ha confermato più recentemente la maniera di vedere di questi ultimi AA., ed ha chiarito il meccanismo di tale progressione. Nelle piante di pomodoro inoculate verso la sommità dello stelo con *B. tumefaciens* si notano (all'esame istologico eseguito ad intervalli, fra 15 minuti e 48 ore dopo la inoculazione), zooglee batteriche che si formano nelle cellule lese dalla puntura e si spostano in seguito verticalmente, lungo gli spazi intercellulari del midollo e del tessuto sottoepidermico: esse sono costituite da batteri inglobati in una gamba gelatinosa; la loro forma dipende dalla forma

dei meati dove si sviluppano; i loro contorni sono netti, e le loro estremità, per dove si effettua la progressione, arrotondate in forma di menisco convesso. I batteri non prendono la via vascolare che raramente, e solo quando i vasi sono stati feriti dalla puntura: le cellule sane non sono mai invase. La velocità di migrazione varia da cm. 0,029 a 0,04 per minuto: la più grande velocità si osserva nei 30 minuti consecutivi alla inoculazione; al termine di 3 ore essa è ridotta alla metà.

Quale che sia il reale meccanismo di invasione dei tessuti da parte del *B. tumefaciens*, pare accertato che questo germe, che pure è fra i fitopatogeni uno dei più attivi, è incapace di attaccare le cellule integre; onde è generalmente considerato un parassita delle ferite. Lo studio del suo modo di comportarsi nelle piante non lese è dunque importante come termine di raffronto col modo di comportarsi dei germi non fitopatogeni. Interessanti sono, a questo riguardo, le osservazioni del Rivera (9). Egli ha deposto sulla epidermide di ricini e gerani il *B. tumefaciens*, con risultati negativi, mentre le piante inoculate con lesioni dei tessuti hanno tutte avuto dei tumori: il risultato restava negativo anche se si proteggevano i germi dal disseccamento con manicotti di garza mantenuti umidi, ed anche se si scioglieva con xilolo il rivestimento cereo dell'epidermide del ricino. Altri esperimenti sono stati fatti dall'A. introducendo il bacillo direttamente nel sistema vascolare delle piante: steli fioriferi di cavolo e rami terminali di ricino, tagliati, sono stati messi in bottiglie con acqua, e sulla superficie di sezione sono stati posti in gran numero *B. tumefaciens*. Questi microbi penetrano nei vasi sezionati, e sono aspirati con la linfa ascendente, invadendo così tutti gli organi; ma le piante così trattate non hanno mai avuto tumori. Tuttavia l'azione stimolante del bacillo si è manifestata in tali casi con la produzione di numerosissime radici sulla superficie di sezione; il che ha fatto concludere al Rivera che il bacillo è certo un parassita delle ferite, sia che il traumatismo rappresenti la porta di entrata dell'infezione, sia piuttosto che esso costituisca una condizione necessaria alla produzione del neoplasma, eccitando l'attività cicatriziale dei tessuti, la quale sarebbe esagerata e deviata sotto l'azione costante dei batteri, sempre presenti nei tumori in via di accrescimento.

Da queste e da altre ricerche emerge intanto la constatazione indubbia che la linfa ascendente è capace di trasportare i germi che abbiano comunque superata la barriera epidermica della pianta in tutte le parti di essa, con una forza ascensionale che appare molto più importante e complessa di quanto poteva essere giudicata in passato, specie per merito di Bose (10); che ha reso noti in un grosso volume i risultati dei suoi studi sul meccanismo dell'ascensione della linfa. Egli dichiara che il problema di tale ascensione è uno dei più oscuri della fisiologia vegetale. La teoria generalmente ammessa è che la forza motrice necessaria per l'ascensione sia fornita dalla pressione esercitata dalle radici e soprattutto dal movimento di trazione che si opera dalle foglie mediante la traspirazione. Per Bose, invece, l'ascensione della

linfa non è un fenomeno puramente meccanico, ma è dovuto essenzialmente all'attività di speciali cellule pulsanti, situate nell'assise più profonda della corteccia: gli agenti fisici interverrebbero solo per favorire accessoriamente il movimento. In quanto ai vasi del legno, situati in prossimità della assise pulsatrice, essi non sono altro che un serbatoio drenante l'eccesso della linfa, e non hanno che una parte passiva nella circolazione. Le pulsazioni delle cellule che, con le loro contrazioni ritmiche, fanno circolare la linfa, hanno potuto essere registrate dall'A. con procedimenti elettrici.

Comunque sia, è certo che la linfa ascendente può diffondere i germi in tutti gli organi della pianta; ma tale diffusione, come risulta anche dagli studi di Rivera, non rappresenta necessariamente una causa di malattia per la pianta, anche se si tratti di germi fitopatogeni; a maggior ragione, poi, rimane senza effetti deleteri la penetrazione di germi non patogeni per la pianta. Quale è allora la sorte di questi germi?

Korinek (11) ha visto che la fava si mostra assolutamente insensibile a microbi saprofiti (bacillo prodigioso) introdotti nei suoi tessuti, sia per inoculazione sia coltivando in sospensione batterica gli steli tagliati. Ma, mentre gli animali distruggono rapidamente i microbi saprofiti, nelle piante essi persistono lungamente, allo stato di vita latente, accollati alle pareti cellulari. Bisognerebbe pertanto supporre che la linfa che avvolge in questi casi i germi non espliciti su di essi alcuna azione deteriorante. Essa li assume e li trasporta con la stessa azione indifferente con la quale assume e trasporta le sostanze nutritive. Ma contro tale ipotesi stanno numerosi lavori, i quali arrivano alla conclusione che la pianta si difende, contro qualsiasi tipo di germe, con gli stessi meccanismi che mette in moto l'organismo animale.

Il problema se le piante offrano all'aggressione dei batteri la stessa resistenza istogena ed umorale che offrono l'uomo e gli animali, e se in esse la penetrazione di antigeni è seguita dalla formazione di anticorpi, ha sempre appassionato gli studiosi. Lasciando da parte l'abbondantissimo materiale costituito dagli studi sulla immunizzazione artificiale delle piante, e prendendo in esame soltanto la questione delle eventuali difese naturali, si può notare come, in circa un quarantennio di ricerche, non si è ancora potuto arrivare ad un accordo, sia pure generico, da parte degli studiosi.

Fin dal 1902 Kobert (12) aveva annunciato che le differenti proteine vegetali sono capaci di agglutinare le emazie di diversi vertebrati. Poco dopo Mendel (13) ottenne da certe specie di fagioli e di piselli delle emoagglutinine, più attive sul sangue di coniglio che su quello di maiale.

Furono allora iniziate ricerche sistematiche, specie ad opera di Kritschewsky (14, 15, 16), che trovò in alcune piante sostanze agglutinanti e precipitanti per il bacillo tifico, il vibrione colerigeno ed il bacillo tubercolare umano, capaci di agire anche a notevoli diluizioni (1/450 le agglutinine e 1/150 le precipitine). Secondo K., tali anticorpi sarebbero, con la massima probabilità, inclusi nel succo cellulare delle piante: le foglie di una stessa pianta possono differire le une dalle altre per il tenore in anticorpi; ma que-

sti si trovano, oltre che nelle foglie, anche nello stelo, e probabilmente anche nelle radici delle piante.

Quasi contemporaneamente, Wagner (17, 18) rese noto l'esito di sue ricerche, dalle quali risultava che nei succhi delle piante si riscontravano tre specie di sostanze antibatteriche, capaci di agire anche *in vitro*, e precisamente: 1) agglutinine, che immobilizzano i germi; 2) lisine, che rigonfiano le membrane dei germi e li distruggono; 3) sostanze inibitrici dello sviluppo, che impediscono la formazione delle spore e lo sviluppo dei germi protetti da spesse membrane contro l'azione delle lisine.

Anche secondo Vigliano (19) molte piante danno un succo che agglutina i microbi o le emazie di montone, o dissolvono tali emazie, o esercitano azione antiemolitica; e, secondo le differenti piante e le diverse parti di esse, tali azioni possono manifestarsi a 37° e non già a temperature inferiori ai 15°: i principi che le determinano passano benissimo attraverso i filtri di carta ma vengono in parte trattenuti da quelli di amianto.

Per Arata (20), che ha studiato l'infezione dei fagioli da parte del *Botrytis cinerea*, non vi è dubbio che una specie di immunità naturale esiste anche nelle piante non vaccinate; e Duggar e Armstrong (21) hanno visto che il succo di piante refrattarie al virus del tabacco è capace di inattivare il virus stesso, con azione specifica; ma essi ammettono che tale azione sia più probabilmente legata ad un fenomeno di adsorbimento del virus da parte dei corpuscoli colloidali più voluminosi del succo anzichè alla attività di anticorpi; come lo lascerebbe supporre anche il fatto che il potere inibitore si trova diminuito dalla filtrazione del succo per porcellana.

Interessanti sono anche le ricerche di Magrou (22, 23), che in alcune specie di orchidee ha scoperto delle sostanze attive contro i funghi simbiotici di tali piante: sostanze specifiche e termolabili, aventi i caratteri essenziali degli anticorpi che si sviluppano negli animali immunizzati; tanto è vero che l'A. ne ammette senz'altro la equivalenza; e pensa che esercitino nella patologia dei vegetali lo stesso ruolo degli anticorpi degli animali: si tratterebbe di agglutinine, svelabili anche nelle piante sane e non vaccinate; e di precipitine e lisine che si troverebbero soltanto nelle piante infette o vaccinate.

Contro queste ricerche affermative, conviene citare quelle di Silberschmidt (24), che non è riuscito a mettere in evidenza anticorpi precipitanti per il virus del mosaico del tabacco, sia nelle piante recettive che in quelle refrattarie; di Gheorghiu (25), che hanno condotto l'autore a concludere che anche nelle piante vaccinate il meccanismo della immunità resta oscuro, in quanto tutti i mezzi impiegati per svelare gli anticorpi sono rimasti infruttuosi; e finalmente quelle di Carbone e Arnaudi (26), sulla linfa elaborata e sulla linfa ascendente del gelso moro: la linfa elaborata da piante sane e non vaccinate è risultata provvista di un potere agglutinante per le emazie di montone e di un potere antiemolitico, ma sprovvista di emolisine; ed anche di agglutinine verso tutti i microbi impiegati, ad eccezione del bacillo tifico

e del vibrione colerigeno, che furono agglutinati una sola volta. La linfa ascendente si è mostrata capace di assorbire antigeni ed anticorpi; ma l'assorbimento di antigeni non dà luogo, nella linfa bruta, alla comparsa di anticorpi. Di fronte a questi fatti, C. e A. si mostrano molto scettici sulla presenza di veri anticorpi nelle piante: essi dicono che gli autori che hanno creduto di avere risultati positivi si sono trovati probabilmente di fronte a reazioni umorali pseudospecifiche, che sembrano molto diffuse nel regno vegetale; ma non si può dire se esse abbiano importanza nella immunità naturale od acquisita delle piante.

Volendo seguire quest'ultima tesi, che appare molto ragionevole, e non potendosi confutare i risultati dei molti autori che hanno constatata l'azione battericida di numerose piante, conviene pensare che fattori biologici ordinari di tali piante siano tanto sfavorevoli ai germi da provocarne la morte in breve tempo. Ma quali potrebbero essere questi fattori?

Politis (27) ritiene che la difesa naturale delle piante sia, almeno per la massima parte, affidata ai mitocondri. Egli dice che l'invasione parassitaria eccita i mitocondri, come si può rilevare dalla persistenza del colore verde negli aranci invasi dalla cocciniglia (colore che è dovuto ai cloroplastidi, che non sono altro che mitocondri altamente differenziati) e dalla produzione nelle piante parassitate di pigmenti antocianici e tannici, che possono probabilmente esplicitare un ruolo nella difesa dei vegetali contro i parassiti: tale reazione varierebbe nelle diverse piante e, in una stessa pianta, nelle diverse parti di essa: ma Beauverie (28, 29) sostiene invece che i mitocondri ed i plastidi diventano più fragili a livello dei tessuti parassitati come si può giudicare dalla loro diminuita resistenza ad una soluzione di saponina.

Wagner (30), che abbiamo visto sostenitore convinto della presenza di anticorpi, dà anche grande importanza alla elevazione di acidità delle piante ammalate, che aggiungerebbe i suoi effetti a quelli degli anticorpi naturali: conviene aggiungere che la importanza del pH dei succhi delle piante nella resistenza di queste alle infezioni è ammessa dalla maggior parte degli autori; molti anzi spiegano la maggiore suscettibilità ad ammalare delle piante giovani col fatto che in queste i succhi sono neutri od alcalini, diventando acidi soltanto in seguito. A sua volta Stutzer (31) ammette che certe malattie delle piante siano favorite ad una acidità od alcalinità eccessive del suolo.

Per finire, ricorderemo che Petri (32) dà una grande importanza allo stato elettrico dei tessuti nel determinismo delle infezioni delle piante. Egli dice che la capacità elettrostatica dei tessuti dei vegetali viventi diminuisce notevolmente quando essi perdono la loro turgescenza. Questo fenomeno non è in rapporto soltanto con la struttura dei tessuti, considerati come dei condensatori elettrici; ma è determinato anche dalle proprietà dei colloidi idrofili organici, i quali isolati dall'organismo, possiedono allo stato fluido una capacità elettrostatica superiore a quella che presentano quando si riduce il loro grado di dispersione, per evaporazione dell'acqua o per coagulazione. In un tessuto vegetale elettricamente isolato ed al quale sia stata data una carica

elettrica determinata, l'aumento di potenziale consecutivo al disseccamento può essere assai notevole (passando da 160 a 191,30 volta in 40 minuti in una delle esperienze dell'A.). Queste variazioni di potenziale sono di grande interesse dal punto di vista delle condizioni che favoriscono od ostacolano l'attacco delle piante superiori da parte dei microrganismi parassiti; e P. ritiene che, nel caso in cui non appaia sufficiente la spiegazione chimica della sensibilità e della resistenza, si potrà con vantaggio sostituire, alla nozione vaga di una recettività particolare del citoplasma, lo studio dello stato elettrico dei costituenti dei tessuti della pianta.

\* \* \*

Come si vede, nessuna chiara luce illumina ancora il problema delle relazioni fra germi e piante: non sempre pare che queste si traducono in lotta; ed anche quando questa si verifica, il suo meccanismo è assai probabilmente diverso da quello, ormai abbastanza conosciuto, della lotta fra germi ed organismi animali, essendo fondato su fenomeni biologici molto differenti, e che variano da pianta a pianta. Ne deriva che la questione non può essere affrontata e risolta nel suo insieme, ma deve essere frammentata in tanti quesiti quante sono le specie vegetali, od almeno i gruppi di piante molto affini fra di loro: forse dal confronto di tante ricerche potrà anche scaturire un filo conduttore unico.

In considerazione di ciò, e tenendo naturalmente presente la maggiore importanza ed urgenza di tali ricerche sui vegetali destinati all'alimentazione dell'uomo, e specie su quelli che si consumano senza cottura, abbiamo voluto indagare sulla esistenza di un eventuale potere battericida dei succhi di alcuni ortaggi — quasi tutti consumantisi abitualmente crudi — su parecchi germi patogeni od ospiti abituali dell'intestino umano.

In una prima serie di esperimenti, sui risultati dei quali abbiamo riferito tempo fa in una nota alla Società Italiana di Biologia sperimentale (33), abbiamo saggiato il potere antibatterico del succo di broccoli di rape, indivia, lattuga, incappucciata, sedano, finocchio, sui seguenti germi: stafilococco aureo, vibrione colerigeno, bacillo tifico, bacillo dissenterico Shiga, colibacillo comune, *B lactis aërogenes*; osservando il risultato di un contatto prolungato al massimo per 24 ore sulla vitalità dei germi mescolati ai succhi filtrati per filtro di amianto Seitz.

Da questi esperimenti venimmo alla conclusione che non pare si possa parlare di una azione battericida del succo degli ortaggi, almeno tale da poter combattere un inquinamento massivo di essi; mentre l'azione antibatterica da noi riscontrata ci pareva da attribuirsi piuttosto alla naturale acidità dei succhi, efficace almeno sui germi più sensibili alla reazione del loro ambiente vitale.

Annunziavamo pertanto di avere istituito degli altri esperimenti, diretti a saggiare la vitalità degli stessi germi in soluzioni di acidi organici aventi

un pH equivalente a quello riscontrato nei succhi vegetali da noi esaminati. Su questa seconda serie di ricerche riferiamo qui.

\*\*\*

E' noto che tutti i succhi delle piante mostrano reazione nettamente acida al tornasole. Per ciò che riguarda i vegetali da noi esaminati, i valori trovati al comparatore di Hellige furono i seguenti: sedano, pH = 6,6; finocchio, pH = 6,2; lattuga, pH = 6,4; broccoli di rape, pH = 6,3; indivia, pH = 6,5; incappucciata, pH = 6,4.

Circa l'origine di tali acidi, caduta ormai quasi del tutto la ipotesi del Liebig, secondo la quale una parte almeno degli acidi vegetali sarebbe costituita da prodotti intermedi della fotosintesi clorofilliana, si ammette generalmente che tali acidi siano dei prodotti di ossidazione incompleta, specialmente degli zuccheri. Ne abbondano difatti particolarmente i frutti immaturi; mentre le alte parti della pianta ne contengono in assai minor quantità, che va ancora decrescendo dalle foglie verso le radici e dalla corteccia verso l'interno del fusto.

Variazioni dell'acidità, per una stessa pianta, si hanno anche durante le ore del giorno: in quelle notturne l'acidità tende a crescere, ed è massima nelle prime ore del mattino, per poi diminuire gradatamente, diventando minima a prima sera: ciò perchè la temperatura più elevata, l'azione catalitica della luce ed un maggior apporto di ossigeno per l'attività clorofilliana favoriscono l'ossidazione completa.

Secondo la classificazione fatta da Ravenna (34), gli acidi che possono riscontrarsi nelle piante sono assai numerosi, ed appartengono alle seguenti categorie:

1° *Acidi monocarbossilici saturi*: acido formico, acido acetico, acido butirrico, acido isobutirrico, acido isovalerianico, acido caprilico, acido pelargonico.

2° *Ossiacidi monocarbossilici saturi*: acido glicolico, acido lattico.

3° *Acidi monocarbossilici non saturi*: acido metilacrilico, acido angelico, acido sorbico.

4° *Acidi aldeidici*: acido gliossilico.

5° *Acidi bicarbossilici saturi*: acido ossalico, acido malonico, acido mesossalico, acido succinico, acido glutarico, acido adipico.

6° *Acidi bicarbossilici non saturi*: acido fumarico.

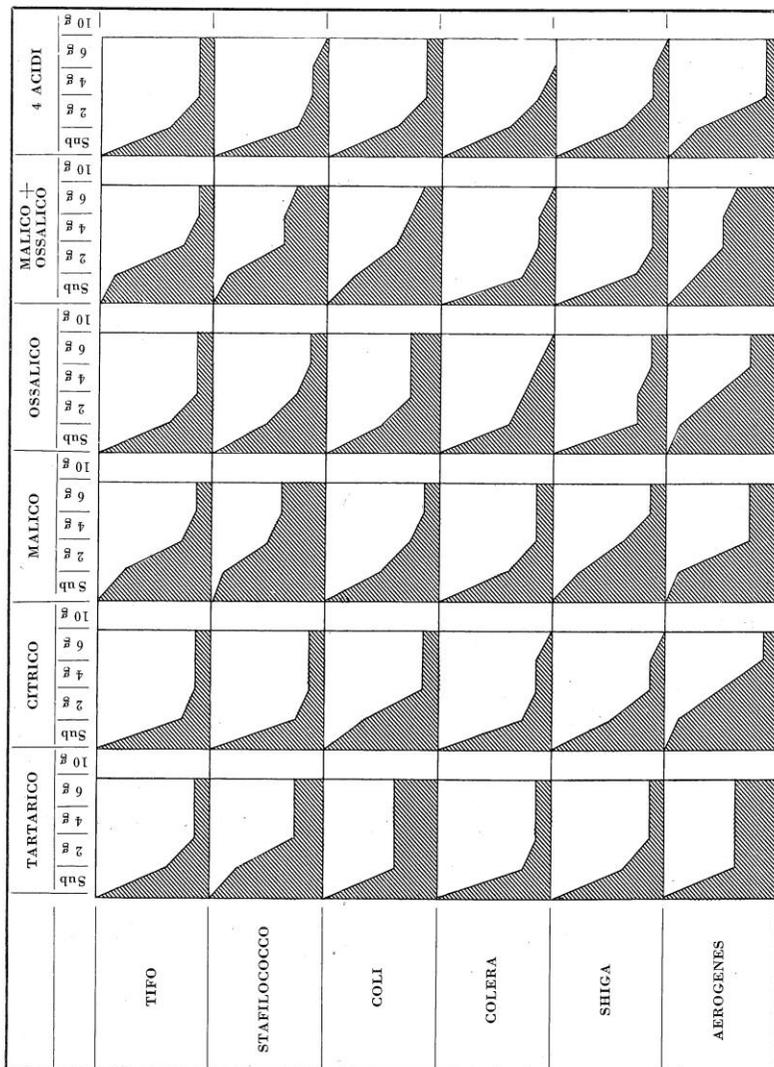
7° *Ossiacidi bicarbossilici*: acido malico, acido tartarico.

8° *Acidi tricarbossilici saturi*: acido tricarballylico.

9° *Acidi tricarbossilici non saturi*: acido aconitico.

10° *Ossiacidi tricarbossilici*: acido citrico.

A questi sarebbero da aggiungere alcuni acidi della serie grassa, come il palmitico, lo stearico, ecc.; delle serie non sature, quali l'oleico, il linoleico, ecc., che entrano nella composizione dei grassi; ed infine gli aminoacidi.



La maggior parte degli acidi summenzionati sono contenuti nelle piante in assai piccola quantità, oppure sono di diffusione non generale. Quelli che per la maggior diffusione e la maggior quantità in cui si ritrovano hanno particolare importanza sono: l'acido ossalico, l'acido malico, l'acido tartarico e l'acido citrico, che vengono pertanto considerati come i veri acidi delle piante.

Abbiamo perciò preparato delle diluizioni dei suddetti quattro acidi in acqua di fonte sterile, in maniera che esse venissero ad avere un pH equivalente a quello medio dei succhi degli ortaggi adoperati nel primo esperimento; e cioè  $\text{pH} = 6,5$ . Altre diluizioni sono state fatte con miscugli di tali acidi; e precisamente: una con acido ossalico ed una con tutti e quattro gli acidi; partendo da diluizioni equivalenti di ciascuno degli acidi, e mescolandole, in quantità uguali, in acqua di fonte sterile, sino ad aversi un  $\text{pH} = 6,5$ .

Le diluizioni degli acidi sono state distribuite in grossi tubi sterili, in ragione di 20 cmc. per ogni tubo; e per ciascun acido o miscela di acidi si è proceduto all'allestimento di una serie di tali tubi inquinati ognuno con una quantità uguale ed approssimativamente nota dei seguenti germi: bacillo tifico, stafilococco aureo, colibacillo, vibrione colerigeno, bacillo dissenterico Shiga, *aerobacter aerogenes*. A tal uopo, da sospensioni di detti germi valutate all'opacimetro di Welcome, veniva prelevata ed introdotta nei tubi la quantità sufficiente a dare la voluta concentrazione batterica (circa 10.000 germi per eme.).

Subito dopo, da ciascun tubo sono state allestite colture a piatto in scatole di Petri con agar semplice, usando 0,1 cmc. di liquido, il che avrebbe dovuto portare allo sviluppo approssimativo di 1000 colonie per scatola. Le cifre trovate dopo 24 ore di incubazione delle piastre in termostato a  $37^\circ$  si sono difatti molto sensibilmente avvicinate a tale numero di colonie.

I tubi inquinati sono stati tenuti a temperatura ambiente (media di  $15^\circ \text{C}$ ) ed all'oscuro. Dopo 2, 4, 6 e 10 giorni è stato ripetuto da ogni tubo; previa accurata agitazione del liquido, l'allestimento delle colture a piatto, con la stessa quantità di liquido; e si è proceduto, dopo 24 ore di incubazione delle piastre a  $37^\circ$ , alla numerazione delle colonie.

I risultati ottenuti, per ragioni di brevità e di chiarezza, vengono compendati nell'accluso prospetto diagrammatico; nel quale si ha subito una impressione visiva della vitalità dei vari germi nei diversi acidi o miscugli di acidi, corrispondente alla vastità della superficie tratteggiata.

Non è quindi necessario soffermarsi dettagliatamente su ogni singolo reperto: si può, in linea di massima, rilevare che il germe meno resistente si è dimostrato — come era da prevedere, e come già avevamo constatato nella prima serie dei nostri esperimenti — il vibrione colerigeno; seguito a breve distanza dal bacillo dissenterico di Shiga e quindi dal bacillo tifico: molto più resistenti si sono rivelati lo stafilococco ed il colibacillo, ed ancora di più *l'aerogenes*. Di tutti i germi saggati si è avuta l'estinzione del solo vibrione colerigeno nella maggior parte degli esperimenti, entro un periodo dai 6 ai

10 giorni dalla sua introduzione nella soluzione acida; e solo una volta del bacillo di Shiga. Per tutti gli altri germi, dopo una riduzione iniziale, in genere notevolissima, del loro numero, si è avuta quasi una stabilizzazione dei risultati, con la sopravvivenza — fino almeno al 10° giorno di esperimento — di un numero più o meno notevole di cellule batteriche.

Il fatto che la distruzione dei germi non sia continuata nei giorni successivi con lo stesso ritmo dei primi giorni, ci ha indotti a fare delle ricerche per accertare se la reazione acida iniziale delle soluzioni fosse stata modificata dalla presenza dei germi. Difatti, la determinazione del pH del liquido di ciascun tubo, al 10° giorno di esperimento, ha fatto rilevare la neutralità od anche una leggiera alcalinità del liquido stesso; sicchè appare evidente che il rallentamento ed arresto della azione battericida delle soluzioni è da attribuirsi precipuamente alla loro neutralizzazione; sempre, si capisce, tenendo presente anche la diversa resistenza che cellule batteriche di una stessa specie possono offrire all'azione di fattori letali chimici e fisici.

Per ciò che riguarda la peculiarità di azione dei diversi acidi, possiamo notare che gli ossiacidi bicarbossilici (acido tartarico, acido malico) si sono dimostrati alquanto meno attivi degli altri; mentre le miscele di acidi, specie quella dei quattro acidi, hanno dimostrato un potere battericida nettamente superiore a quello dei singoli acidi.

Ciò ci induce a pensare che in natura, dove tali miscele sono di norma, si ritrovino condizioni paragonabili alle migliori che abbiamo potuto sperimentalmente determinare per ottenere la uccisione dei germi.

Naturalmente, questi esperimenti non hanno la pretesa di chiarire il meccanismo della difesa chimica dei vegetali quale può verificarsi *in vivo*: troppi altri fattori entrano in ballo in questo caso, sia a favore che a sfavore dei germi, perchè si possa non prenderli in considerazione. I nostri esperimenti, però, confermando l'importanza difensiva dell'acidità del succo delle piante, e precisandone in certo qual modo i limiti, vogliono chiarire uno solo dei lati della questione.

E' da supporre che nella pianta viva, dove gli acidi sono sempre parecchi e dove essi non possono certo venire neutralizzati come si è verificato nei nostri esperimenti *in vitro*, questo solo fatto debba costituire una condizione di assoluto sfavore non solo alla moltiplicazione, ma anche alla vita stessa di germi che non siano veri e propri patogeni delle piante; e che la loro distruzione avvenga entro un periodo di tempo relativamente breve. Nella prima serie dei nostri esperimenti noi vedemmo che non bastano poche ore perchè il succo degli ortaggi si autodepuri; ma anche in quel caso si trattava di esperimento *in vitro*. Si può pertanto ritenere che, se non poche ore, alcuni giorni debbano essere sufficienti alla pianta viva per effettuare tale depurazione.

Ci pare perciò di poter concludere che il pericolo di un inquinamento della compagine degli ortaggi da parte di germi patogeni per l'uomo, penetrati attraverso lesioni dei tessuti delle piante, se anche non deve ritenersi impossibile è certamente assai diminuito, e praticamente annullato, dalla possi-

bilità di autodepurazione di detti vegetali, fondata su meccanismi diversi, fra i quali è da annoverare in prima linea la naturale acidità dei loro succhi.

Resta naturalmente immodificata la questione, molto più preoccupante e complessa, dell'inquinamento superficiale; il cui annullamento è fondato su fattori ambientali esterni grandemente variabili, e sulla detersione che può operare l'uomo, di per sè stessa pericolosa e non sempre efficace.

#### AUTORIASSUNTO

Gli AA., in connessione e proseguimento di loro precedenti ricerche, e di altre compiute nello stesso Istituto, dirette a stabilire la importanza delle verdure quali veicoli di infezioni, hanno studiato la resistenza di parecchi germi patogeni in soluzioni di acidi organici vegetali aventi lo stesso pH dei succhi degli ortaggi che più comunemente si consumano crudi; venendo alla conclusione che l'acidità naturale di detti succhi è un fattore non trascurabile di autodepurazione, specialmente se si accompagna agli altri fattori che possono far sentire il loro peso nella pianta viva.

#### AUTOREFERAT

In Fortsetzung ihrer eigenen früheren Untersuchungen und in Einklang mit anderen Arbeiten des gleichen Institutes, welche den Zweck hatten die Bedeutung der Gemüse bei der Uebertragung von Infektionskrankheiten festzustellen, erforschten die Verff. die Resistenz einiger pathogener Keime in Lösungen von organischen Säuren vegetalischen Ursprungs, welche pH-Werte aufwiesen die jenen der Säfte von gewöhnlich roh konsumierten Gemüsen entsprachen. Die Verff. kamen dabei zur Schlussfolgerung, dass der natürliche Säuregrad dieser Säfte einen nicht unbedeutenden Autodepurationsfaktor darstelle, besonders in Verein mit den übrigen Faktoren die bei der lebenden Pflanze ins Gewicht fallen können.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) *Savulescu T.* - L'immunité aux maladies bactériennes des plantes. « Arch. Roumain. de Pathol. exper. », IX, 209, 1936.
- (2) *Mazzeo M. e Cianci V.* - Sulla possibilità di penetrazione di microrganismi nelle verdure. « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », XV, 567, 1940.
- (3) *Kunkel L. O.* - *Plasmodiophora brassicae* as agent of disease of cabbages. « Jl. Agric. Resear. », XIV, 20, 1918.
- (4) *Young P. A.* - Penetration phenomena and facultative parasitism in *Alternaria*, *Diplodia*, and other fungi. « Bot. Gaz. », LXXXI, 258, 1926.

- (5) *Smith E.* - Are there bacterial diseases of plants? «Zentralbl. f. Bakter.», II, 5, 1899.
- (6) *Riker A. J.* - Studies on the influence of some environmental factors on the development of crown-gall. «Jl. Agric. Resear.», XXXII, 83, 1926.
- (7) *Robinson W. e Walkden H. A.* - A critical study of Crown-gall. «Ann. Bot.», XXXVII, 299, 1923.
- (8) *Ben Hill f.* - The migration of *Bacterium tumefaciens* in the tissue of Tomato plants. «Phytopathology», XVIII, 553, 1928.
- (9) *Rivera V.* - E' necessaria la ferita del tessuto per la produzione di tumori da *B. tumefaciens* sui vegetali? «Boll. Accad. Pugliese di Sc. A.», I, 6, 1926.
- (10) *Bose J. C.* - Physiologie de l'ascension de la sève. «Ed. Gauthier-Villars», Paris, 1927.
- (11) *Korinek J.* - Intoxications par les microbes saprophytes chez les végétaux. «Zvladni otisk z. II rocniku casopisu "Preslia"», Vestnik Československé Botanické, Spolecnosti, 1922 (recens. Boll. Pasteur, XXI, 548, 1923).
- (12) *Kobert R.* - Lehrbuch der Intoxikationen, I, 161; II, 695; 1902.
- (13) *Mendel L. B.* - Vegetable agglutinins. «Jl. Biol. Chem.», VI, 19, 1909.
- (14) *Kritschewsky J. L.* - Ueber bakterielle Agglutinine und Präzipitine vegetablischer Herkunft in Zusammenhange mit der Frage über die Fähigkeit der Pflanzen Immunitätskörper zu produzieren. «Zeitschr. f. Immunitätsf.», XXII, 381, 1914.
- (15) *Kritschewsky J. L.* - Ueber die Eigenschaften bakterieller Agglutinine und Präzipitine vegetablischer Herkunft. «Zeitschr. f. Immunitätsf.», XXIII, 331, 1915.
- (16) *Kritschewsky J. L.* - Hämolytins of vegetable origin. «Jl. Exper. Medic.», XXV, 1, 1917.
- (17) *Wagner R. J.* - Ueber bakterizide Stoffe in gesunden und kranken Pflanzen. I. Mitt.: Die gesunde Pflanze. «Zentralbl. f. Bakter.», Zweite Abt., XLII, 613, 1915.
- (18) *Wagner R. J.* - Wasserstoffionenkonzentration und natürliche Immunität der Pflanzen. «Zentralbl. f. Bakter.», Zweite Abt., XLIV, 708, 1916.
- (19) *Vigliano - Cortese I.* - Sulla presenza nella piante di sostanze agglutinanti, precipitanti, emolitiche ed antiemolitiche. «Boll. Ist. Sier. Milanese», I, 116, 1922.
- (20) *Arata M.* - Il meccanismo dell'immunità nei vegetali. «Boll. Ist. Sier. Milanese», XIV, 558 e 682, 1935.

- (21) *Duggar B. M. e Armstrong J. K.* - The effect of treating the virus of Tobacco mosaic with the juices of various plants. « Ann. Missouri Bot. Garden », XII, 359, 1925.
- (22) *Magrou J.* - L'immunité humorale chez les plantes. « Rev. Path. végét. et Entom. agr. », XI, 189, 1924.
- (23) *Magrou J.* - A' propos du pouvoir fongicide des tubercules d'Ophrydées. « Ann. Sc. nat. Botan. », 10<sup>a</sup> serie, VI, 266, 1924.
- (24) *Silberschmidt K.* - Studien zum Nachweiss von Antikörpern in Pflanzen. Beiträge zur Frage der Resistenz und Immunität von Pflanzen gegenüber dem infizierenden Agens der Viruskrankheiten. « Beiträge zur Biol. der Pflanzen », XX, 105, 1933.
- (25) *Gheorghiu I.* - Étude sur l'immunité chez les plantes. « Ann. Inst. Pasteur », LVII, 204, 1936.
- (26) *Carbone D. e Arnaudi C.* - Nuove esperienze sulle reazioni immunitarie delle piante. « Atti Soc. Ital. Sc. Nat. », LXIII, 269, 1924 e 351, 1925.
- (27) *Politis J.* - Immunità et hérédité chez les végétaux. « Rapp. al 3<sup>o</sup> Congresso internazionale di Patologia comparata », Atene, 1936.
- (28) *Beauverie J.* - La résistance plastidaire et mitochondriale et le parasitisme. « C. R. Acad. Sciences », CLXXII, 1195, 1921.
- (29) *Beauverie J.* - Sur les modes de dégénérescence des chloroplastes particulièrement dans le parasitisme. « C. R. Acad. Sciences », CLXXXIII, 141, 1926.
- (30) *Wagner R. J.* - Wasserstoffionenkonzentration und natürliche Immunität der Pflanzen. « Zentralbl. f. Bakter. », Zweite Abt., XLIV, 708, 1916.
- (31) *Stutzer A.* - Ein Beitrag zur Biochemie der Pflanzen. « Bioch. Zeitschr. », LXXX, 143, 1917.
- (32) *Petri L.* - Le proprietà elettriche dei tessuti vegetali viventi. « Boll. R. Staz. di Patol. veget. », VI, 71, 1926.
- (33) *Mazzeo M. e Marinelli G.* - Hanno i succhi degli ortaggi potere battericida? « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », XV, 730, 1940.
- (34) *Ravenna C.* - Chimica vegetale, «Ed. Zanichelli », Bologna, 1926.

# Ricerche microbiologiche sui formaggi molli italiani

I - OSSERVAZIONI SUL QUARTIROLO DI MONTE

C. Arnaudi      E. Corberi      H. Soares Rodrigues

(Ricevuto il 1° Dicembre 1940 - XIX)

Le ricerche sui formaggi molli italiani non sono numerose e quanto riguarda la microflora tipica ed il suo intervento nei processi di maturazione, è stato oggetto di pochi studi, la massima parte dei quali riguarda il gorgonzola. Questo formaggio, è stato studiato infatti, già alla fine del secolo scorso, dal lato tecnologico, chimico e microbiologico. Ricorderemo i lavori di Musso e Menozzi (1), Maggiora Vergano (2), Samarani (3), Arnaudi (4-5), De Tomasi (6), Bondioli (7), Caserio ed Erba (8), che stabilirono le caratteristiche chimiche e biologiche della maturazione di questo tipico formaggio italiano. Dobbiamo poi a Gorini (9-10-11-12) fruttuose ricerche sugli agenti microbici di varie alterazioni del gorgonzola e sulle relative prevenzioni. Fra gli altri pochi lavori riguardanti i formaggi molli nostrani, vanno ricordati quello di Pascetti (13) sul Castelmagno e quelli di Sacchetti (14-15), a carattere nettamente microbiologico, su un formaggio di Castel S. Pietro (Bologna).

È sembrato cosa utile pertanto, al fine di contribuire alla razionalizzazione della tecnologia dei formaggi molli, di intraprendere ricerche sistematiche sui più importanti formaggi molli italiani.

Abbiamo iniziato la serie con il *quartirolo di monte*, scegliendo un tipo che riproduce in modo prevalente le caratteristiche dell'antico quartirolo di monte, conservato ormai da pochi produttori (\*)

L'antico quartirolo era caratterizzato specialmente dal tipo di latte con il quale veniva preparato. Esso proveniva da mandrie che, salite ai pascoli alpini, erano nutrite con la *quarta erba*, chiamata appunto «quartirola» e che per la sua composizione floristica è particolarmente atta a conferire al latte un aroma tipico che passa ai derivati caseari. Attualmente il comune quartirolo è fabbricato con latte d'ogni stagione e d'ogni taglio di erba: soltanto la forma (quadrata e non eccessivamente spessa) ripete le caratteristiche del tipico quartirolo di monte.

Il formaggio viene fornito in genere da piccoli casari, che provvedono

---

(\*) Il quartirolo di monte da noi studiato è il così detto Taleggio Cademartori prodotto in Valsassina, Val Varrone e Val Taleggio, che è stato stabilizzato nei suoi caratteri tipici attraverso la regolazione delle varie fasi di maturazione.

direttamente alla cagliatura del latte intero appena munto — cioè a temperatura naturale —. La cagliatura viene fatta con un presame distribuito dalla Casa che provvederà alla maturazione e viene provocata in apposite forme distribuite e controllate periodicamente dalla Casa stessa. Le forme fresche vengono sistemate in apposite casse che sono poi impilate in celle riscaldabili d'inverno e dove la temperatura estiva oscilla fra 8° e 12° C.

In questa prima fase della maturazione ha luogo lo spurgo, mediante il quale il formaggio perde gran parte del siero e si ricopre di una lieve muffa bianca, umida, dall'aspetto di velo opaco. L'abilità tecnica del maturatore consiste nell'apprezzare il momento giusto per arrestare questa cosiddetta «fioritura», che viene determinato al tatto, apprezzando la tipica gommosità e viscosità della superficie del formaggio in questo momento. Le forme vengono allora portate in altro ambiente, più freddo più caldo a seconda della stagione, nel quale si praticano la prima e la seconda salatura. La terza salatura ha luogo in un ambiente comune. Per ogni quintale di prodotto fresco occorrono da 4 a 5 kg. di sale. Il formaggio passa quindi alla stagionatura nelle grotte. Queste caverne naturali si aprono nelle anfrattuosità della montagna e sono assai frequenti in Valsassina. La pavimentazione è mantenuta in acciottolato e ghiaia e assai spesso si trovano nelle pareti profonde fessure che comunicando con altre caverne, esistenti nell'interno della montagna, recano di continuo aria umida e fresca che mantiene un grado di temperatura e di umidità costante.

Nelle grotte di maturazione sono adattate delle impalcature in legno che consentono la sistemazione del formaggio, che viene periodicamente rivoltato, pulito con acqua salata e selezionato, allo scopo di eliminare gli scarti.

Il formaggio maturo presenta una pasta d'aspetto burroso a crosta leggermente piccante, ricoperta da una muffa di color rosso mattone, che è caratteristica del formaggio e che lascia al tatto una intensa e vivace colorazione giallo-rossastra.

A questo tipico ammuffimento viene attribuito dai pratici una grande importanza nell'andamento della maturazione: infatti quando esso non ha luogo regolarmente, il formaggio assume un sapore amaro ed acidulo.

Al termine della stagionatura, la crosta del formaggio si presenta in modo diverso — a seconda è più o meno asciutto —. In quest'ultimo caso la crosta assume un aspetto scaglioso e polverulento.

La maturazione e la stagionatura si compiono normalmente in 40-60 giorni.

Sulla base di queste notizie, raccolte presso i caseifici che si occupano della maturazione e stagionatura del formaggio, abbiamo elaborato un piano di osservazioni e rilievi, atti a determinare le variazioni cui soggiace la microflora del quartirolo durante le varie fasi di preparazione e di maturazione. Le nostre osservazioni sono state compiute su molti campioni, prelevati a diversi gradi di maturazione, e riguardano rilievi microscopici diretti, esami microbiologici e chimici.

La ricerca microbiologica si è proposta di accertare la carica complessiva dei micròbi presenti nel formaggio nei tre stadi di maturazione e le forme microbiche che assumono un carattere tipico e prevalente. Nelle nostre intenzioni, le ricerche microscopiche dirette dovevano integrare lo studio microbiologico e contribuire a dare un'idea dei raggruppamenti naturali che alcuni micròbi possono assumere nel formaggio. Infine, i sommari saggi chimici sono stati fatti al fine di confrontare il quartirolo di monte, con i similari formaggi molli, italiani e stranieri.

I campioni usati appartenevano, come si è detto, a tre stadi di maturazione: 1) a sei giorni dalla cagliatura; 2) a quindici giorni dalla cagliatura; 3) formaggio maturo. Per ogni fase abbiamo esaminato la crosta, la pasta immediatamente sotto la crosta e quella della zona centrale.

L'aspetto ed i caratteri dei campioni erano i seguenti: 1) Campione di sei giorni: forma quadrangolare, pasta poco consistente ed elastica, odore e sapore di latticello; qua e là, rari ciuffi di muffa bianca. 2) Campione di quindici giorni: forma quadrangolare, pasta alquanto più elastica, odore poco pronunciato, sapore più salato del campione precedente; in superficie, ciuffi di muffa bianca e rossiccia. 3) Campione maturo: forma quadrangolare, pasta più asciutta, di consistenza burrosa. Lieve odore di tartufo, sapore di formaggio maturo sapido e lievemente piccante. In superficie, prevalenza della muffa rosso mattone. Nelle anfrattuosità della crosta, piccole macchie di muffa bianca a riflessi verdastri.

#### CONTEGGIO DELLA MICROFLORA TOTALE

Il procedimento seguito per rilevare il numero di micròbi contenuti in un gr. di formaggio è consistito nella numerazione delle colonie cresciute entro otto giorni, in piastre allestite coi più comuni terreni culturali a diverse diluizioni, partendo da materiali provenienti dai tre stadi di maturazione.

Un pezzetto di formaggio prelevato asetticamente veniva pesato su piastra sterile e quindi spappolato in mortaio con acqua sterile, in modo da ottenere una sospensione omogenea corrispondente a 1/10 del peso. Da questa sospensione si derivavano le successive diluizioni necessarie per allestire le piastre. I valori raccolti nella tabella N. 1 rappresentano la media dei valori di tre determinazioni fatte a tre diluizioni diverse. Le piastre di agar comune, agar al siero di latte ed agar latte vennero messe ad incubare a 37° C.; quelle di agar malto ed agar Carugati a 30° C. La lettura veniva fatta dopo 24 ore e ripetuta dopo cinque ed otto giorni.

Dai valori sopra esposti emergono alcuni fatti: fin dal sesto giorno, nella parte centrale del formaggio sono presenti microrganismi in grande quantità; il loro numero aumenta dai primi stadi fino al 15° giorno, per poi decrescere notevolmente. Indipendentemente dallo stadio di maturazione, appaiono più numerosi i micròbi che crescono in agar comune ed in agar malto. Assai minori sono quelli che si sviluppano nel latte e nel siero agarizzato. Pare che sia possibile rilevare una certa proporzione fra il numero

TABELLA I

| Terreni<br>nutritivi       | NUMERO DEI MICRORGANISMI |                          |                    |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
|                            | Campione di<br>6 giorni  | Campione di<br>15 giorni | Campione<br>maturo |
| Agar comune . . . . .      |                          |                          |                    |
| sopra crosta . . . . .     | 29.800.000               | 67.000.000               | 168.000.000        |
| sotto crosta . . . . .     | 79.000.000               | 69.500.000               | 22.500.000         |
| centro . . . . .           | 69.000.000               | 202.400.000              | 27.500.000         |
| Agar malto . . . . .       |                          |                          |                    |
| sopra crosta . . . . .     | 126.000.000              | 210.000.000              | 190.200.000        |
| sotto crosta . . . . .     | 138.000.000              | 104.000.000              | 24.000.000         |
| centro . . . . .           | 152.000.000              | 160.000.000              | 131.000.000        |
| Agar siero latte . . . . . |                          |                          |                    |
| sopra crosta . . . . .     | 25.200.000               | 54.900.000               | 97.500             |
| sotto crosta . . . . .     | 12.000.000               | 90.000.000               | 1.175.000          |
| centro . . . . .           | 26.300.000               | 84.000.000               | 4.750.000          |
| Agar latte . . . . .       |                          |                          |                    |
| sopra crosta . . . . .     | 7.000.000                | 29.700.000               | 3.800.000          |
| sotto crosta . . . . .     | 44.000.000               | 22.500.000               | 39.000.000         |
| centro . . . . .           | 12.000.000               | 89.500.000               | 69.000.000         |
| Agar Carugati . . . . .    |                          |                          |                    |
| sopra crosta . . . . .     | 12.500.000               | 35.000.000               | 1.700.000          |
| sotto crosta . . . . .     | 27.000.000               | 235.000.000              | 4.650.000          |
| centro . . . . .           | 88.000.000               | 321.000.000              | 1.800.000          |

delle colonie acidificanti sviluppatesi nel terreno Carugati e quelle nate negli altri mezzi nutritivi. Nei primi stadi (6-15 giorni) il numero delle colonie di acidificanti sviluppatasi in agar Carugati è sensibilmente uguale (per uno stesso prelevamento) a quello delle colonie nate negli altri terreni sopra menzionati. Negli ultimi stadi invece, la proporzione esistente è di gran lunga più bassa per gli acidificanti, fatto che è coerente con l'andamento della maturazione. Questo rilievo è confermato pure dalla determinazione della acidità attuale della pasta, il cui valore determinato potenziometricamente è risultato essere di:

- pH 5,5 per il campione di 6 giorni;
- pH 5,8 per il campione di 15 giorni;
- pH 6,3 per il campione di formaggio maturo.

Anche per quanto riguarda lo sviluppo dei micròbi della crosta si constata una forte diminuzione dei microrganismi caseari nei campioni di formaggio maturo rispetto ai precedenti di sei e di quindici giorni, mentre i microrganismi sviluppatasi in agar comune subiscono un progressivo aumento e quelli nati in agar malto si mantengono in numero pressochè costante.

Per quanto riguarda la quantità di micròbi dell'interno della pasta, si rileva una curva che ha il suo massimo nei campioni di 15 giorni, ed una caduta, specialmente spiccata per il gruppo dei caseari (sviluppanzansi in agar al siero di latte) nel formaggio maturo.

#### RAGGRUPPAMENTI MICROBICI CONSTATATI

Utilizzando le piastre allestite per il conteggio e particolarmente quelle fatte con le diluizioni più alte, presentanti un esiguo numero di colonie, è stato possibile di constatare (con approssimazione molto relativa), la proporzione esistente fra i principali raggruppamenti di microrganismi. I risultati di tali rilievi sono raccolti nella tabella N. 2..

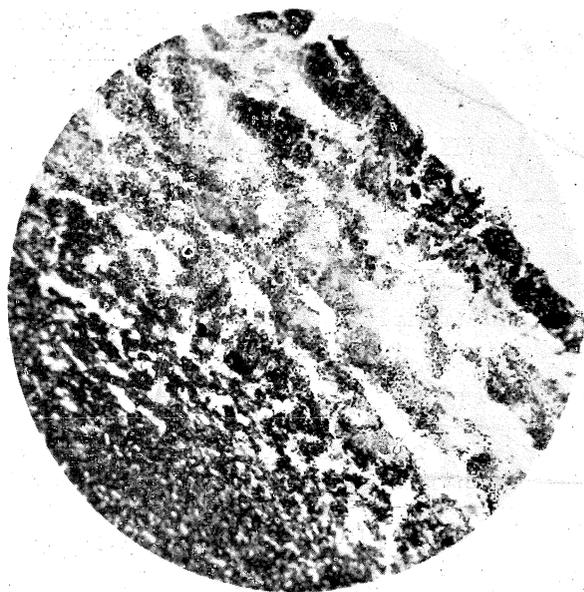
Dall'esame dei risultati raccolti nella tabella N. 2 si possono trarre de-

TABELLA II

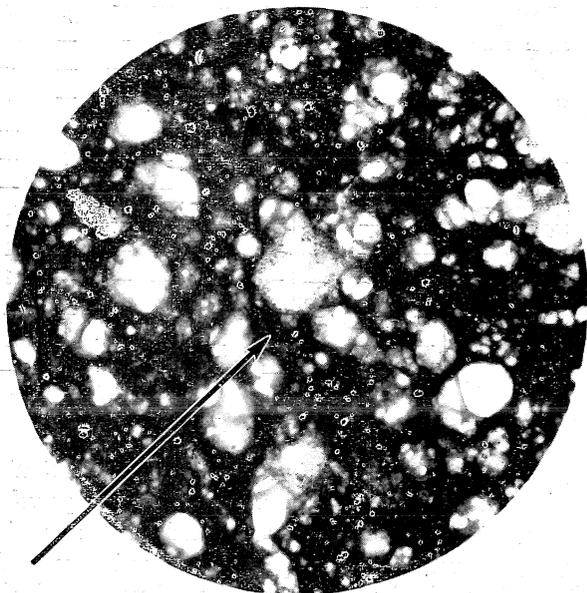
| Raggruppamenti<br>microbici | Origine<br>del campione | Campione di<br>6 giorni |       |       | Campione di<br>15 giorni |        |       | Campione<br>maturo |        |       |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|-------|--------------------------|--------|-------|--------------------|--------|-------|
|                             |                         | Ac.                     | Acpr. | Prot. | Ac.                      | Ac.pr. | Prot. | Ac.                | Ac.pr. | Prot. |
| Cocchi . . . .              | sopra crosta            | 3                       | 1     | —     | 6                        | —      | —     | 3                  | 3      | 5     |
|                             | sotto crosta            | 3                       | —     | —     | 8                        | —      | 1     | 4                  | —      | —     |
|                             | centro                  | 4                       | —     | —     | 8                        | —      | —     | 1                  | 1      | —     |
| Bacilli tipo Bulgar.        | sopra crosta            | —                       | —     | —     | 6                        | —      | —     | 1                  | —      | —     |
|                             | sotto crosta            | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | 1                  | —      | —     |
|                             | centro                  | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | 1      | —     |
| Bacilli sporificati .       | sopra crosta            | —                       | —     | 5     | —                        | —      | 4     | —                  | —      | 3     |
|                             | sotto crosta            | —                       | —     | 1     | —                        | —      | 1     | —                  | —      | —     |
|                             | centro                  | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | —      | 1     |
| Lieviti . . . .             | sopra crosta            | —                       | —     | —     | 9                        | 7      | —     | 2                  | 3      | —     |
|                             | sotto crosta            | 2                       | —     | —     | 1                        | —      | —     | 1                  | 1      | —     |
|                             | centro                  | 1                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | —      | —     |
| Streptotricce . . .         | sopra crosta            | —                       | —     | —     | —                        | —      | 1     | —                  | —      | 1     |
|                             | sotto crosta            | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | —      | 1     |
|                             | centro                  | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | —      | 1     |
| Ifomiceti . . . .           | sopra crosta            | —                       | —     | —     | —                        | —      | 1     | —                  | —      | 3     |
|                             | sotto crosta            | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | —      | 1     |
|                             | centro                  | —                       | —     | —     | —                        | —      | —     | —                  | —      | —     |

Ac. = acidificanti      Acpr. = Acidoproteolitici      Prot. = Proteolitici

duzioni che sono coerenti con i rilievi compiuti con l'analisi quantitativa prima esposta. Appare infatti evidente come in un primo tempo prevalga l'attività dei microrganismi acidificanti che hanno un predominio numerico sugli altri micròbi presenti. In un secondo tempo, tale predominanza tende a diminuire e si ha la comparsa degli acidoproteolitici e dei proteolitici, che



*Sezione di Quartirolo di monte  
(formaggio di 8 giorni) ingr.  
280.*



*Sezione di Quartirolo di monte  
(formaggio di 8 giorni) ingr.  
600.*

*Sezione di Quar-  
tirolo di monte  
(formaggio di  
15 giorni) ingr.  
600.*



*Sezione di Quar-  
tirolo di monte  
(formaggio ma-  
turo) ingr. 600.*

nella fase finale assumono un netto predominio mentre si va affermando l'azione della microflora superficiale tipicamente ifomicetica che esplica essa pure una spiccata attività proteolitica.

## RICERCHE MICROSCOPICHE

La dimostrazione della funzione dei microrganismi nella maturazione dei formaggi e della loro distribuzione nella massa, a guisa di coloniette naturali, è stata data da tempo dal Gorini soprattutto per i formaggi a pasta dura (grana) con l'esame di sezioni ottenute al microtomo da pezzetti di formaggio, fissati con una tecnica analoga a quella che si usa in istologia (16).

Per il quartirolo di monte abbiamo voluto impiegare una tecnica simile onde vedere se fosse possibile accertare la distribuzione dei microrganismi durante le varie fasi di maturazione. A questo scopo abbiamo fatto sezioni di campioni di formaggio di 6, 15 giorni e di formaggio maturo. La tecnica impiegata è stata la seguente: dai campioni venivano tagliati dei pezzetti di formaggio di forma cubica di circa un cm di lato che venivano posti nei seguenti liquidi fissativi per i tempi sotto indicati:

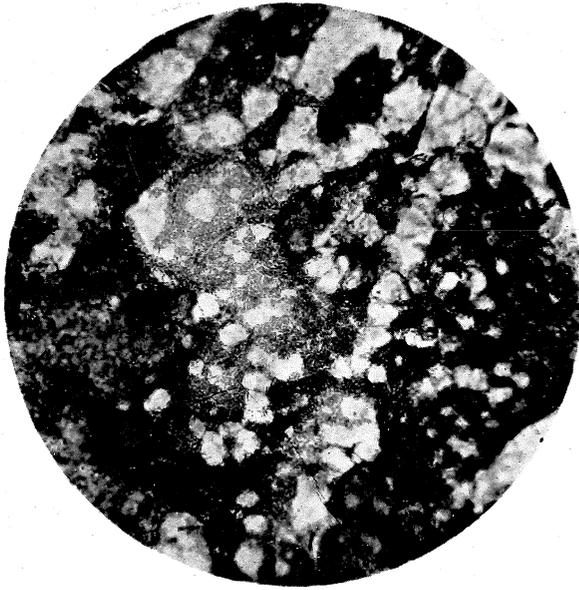
|                             |     |       |
|-----------------------------|-----|-------|
| Formalina . . . . .         | Ore | 96    |
| Alcool a 70° . . . . .      | »   | 24    |
| » » 80° . . . . .           | »   | 12    |
| » » 95° . . . . .           | »   | 6     |
| » assoluto I . . . . .      | »   | 4     |
| » » II . . . . .            | »   | 2     |
| Olio di anilina . . . . .   | »   | 12-16 |
| Toluolo . . . . .           | »   | 2     |
| Paraffina 44°-46° . . . . . | »   | 4     |
| » 56°-58° . . . . .         | »   | 2-3   |

Tagli al microtomo di sezioni aventi come spessore 4 ÷ 8 micron.

Le sezioni venivano montate su ventrini porta-oggetti accuratamente puliti (bicromato di potassio, acido solforico. Lavaggio con acqua e poi con alcool) e quindi asciugati.

Dopo il montaggio, abbiamo proceduto alla sparaffinatura con il seguente procedimento:

|  |                      |       |
|--|----------------------|-------|
| Toluolo I . . . . .                    | 10-15 minuti secondi |       |
| » II . . . . .                         | 10-15 »              | »     |
| Alcool assoluto . . . . .              | 10 »                 | »     |
| » » a 95° . . . . .                    | 10 »                 | »     |
| » » » 80° . . . . .                    | 10 »                 | »     |
| » » » 60° . . . . .                    | 10 »                 | »     |
| Acqua corrente . . . . .               | 3-4 »                | primi |
| Risciacquo breve con acqua distillata. |                      |       |
| Colorazione con blu di Löffler         |                      |       |



Sezione di Quartiolo di monte (formaggio maturo) in gr. 600.

|                                 |     |   |                |
|---------------------------------|-----|---|----------------|
| Acqua corrente . . . . .        | 3-4 | » | primi          |
| Risciacquo con acqua distillata |     |   | (sino a diffe- |
| Alcool a 80° . . . . .          | 3-4 | » | » renziazione) |
| » » 95° . . . . .               | 1-2 | » | »              |
| » assoluto I . . . . .          | 1-2 | » | »              |
| » » II . . . . .                | 1-2 | » | »              |
| Toluolo . . . . .               | 1-2 | » | »              |
| Montaggio in balsamo . . . . .  | 1-2 | » | »              |

Dalle osservazioni dei preparati, si può notare come fino al sesto giorno si trovino diffuse nella massa del formaggio delle colonie costituite per la massima parte da cocchi. Tali colonie naturali appaiono nettamente separate le une dalle altre.

Sulla superficie della crosta si nota l'attecchimento ed il diffondersi di ifomiceti. Nei preparati provenienti da formaggio di 15 giorni e da quello maturo, si può osservare il progredire dello sviluppo di ifomiceti che penetrano anche lievemente nella massa del formaggio. Nei preparati di formaggio maturo, le colonie schizomicetiche sono numerose e tendono a confluire. L'aspetto del preparato è tale per cui si direbbe che tutta la massa del formaggio è costituita da corpi microbici.

## RILIEVI CHIMICI

I rilievi chimici sono stati eseguiti su campioni di sei giorni e su formaggio maturo. I risultati raccolti nella tabella N. 3 prendono in considerazione l'umidità, i grassi, il cloruro sodico, l'azoto totale, le sostanze proteiche, l'azoto solubile e quello aminico, secondo i metodi generali stabiliti dalla

TABELLA III

| Formaggi                                 | Umidità | Grasso | NaCl | Ceneri | N totale | Sost. proteiche<br>Nx 6,37 | N solubile | N aminico | Coef. di<br>maturazione |
|--|---------|--------|------|--------|----------|----------------------------|------------|-----------|-------------------------|
| Quartirollo di monte<br>(6 giorni) . . . | 49,6    | 25     | 1,64 | 3,16   | 3,13     | 19,9                       | 1,44       | 0,03      | 0,46                    |
| Quartirollo di monte<br>(maturo) . . .   | 45,2    | 27     | 2,92 | 5,30   | 3,38     | 21,5                       | 2,36       | 0,45      | 0,99                    |
| Gorgonzola . . .                         | 40,19   | —      | 2,26 | 3,60   | 3,33     | Nx6,25<br>20,81            | 1,95       | 0,22      | 0,56                    |
| Camembert . . .                          | 42,25   | 30,3   | —    | 4,70   | —        | 19,00                      | —          | —         | —                       |
| Camembert . . .                          | 49,31   | 22,5   | —    | 4,70   | —        | 20,10                      | —          | —         | —                       |
| Neufchatel . . .                         | 37,90   | 41,3   | —    | 3,40   | —        | 23,60                      | —          | —         | —                       |
| Brie . . . . .                           | 50,04   | 27,5   | —    | 4,12   | —        | 27,50                      | —          | —         | —                       |
| Roquefort . . .                          | 38,84   | 35,18  | —    | 5,98   | 3,20     | 20,00                      | —          | —         | —                       |

Commissione per lo studio dei problemi dell'alimentazione. Nella tabella N. 3 sono riportati anche i dati analitici riguardanti i più importanti formaggi molli stagionati, sia italiani che stranieri, allo scopo di consentire eventuali raffronti.

Per la determinazione dell'umidità abbiamo usato il solito metodo di essiccazione in stufa Gay-Lussac. Per il grasso, il metodo volumetrico di Gerber; per gli azoti totale e solubile, il metodo Kjeldhal. Abbiamo determinato le sostanze proteiche, sulla base dell'azoto totale calcolato come caseina, moltiplicato per il fattore 6,37.

L'azoto aminico è stato determinato con l'apparecchio van Slyke.

Le ceneri sono state calcolate per differenza sulla base del peso del formaggio incenerito.

N solubile

Il coefficiente di maturazione è dato dal rapporto:  $\frac{\text{N solubile}}{\text{N totale}}$

### PRINCIPALI SPECIE MICROBICHE RISCOINTRATE

L'esame dei principali raggruppamenti microbici che successivamente compaiono durante le varie fasi di maturazione, ha messo in evidenza (come già si è detto), una prima fase di acidificazione seguita da una sempre più pronunciata azione proteolitica, dovuta in gran parte a microrganismi acido-

proteolitici e soprattutto ad ifomiceti. Questi ultimi conferiscono una caratteristica tipica al formaggio, sia organolettica che nei riguardi dell'aspetto esteriore.

È sembrato opportuno esaminare un po' dettagliatamente alcuni stipiti appartenenti ai vari raggruppamenti microbici ritrovati, scegliendoli fra i moltissimi isolamenti compiuti (oltre un centinaio) dopo un primo confronto delle loro caratteristiche morfologiche e fondamentali proprietà culturali, in guisa da considerare solamente quelli presentanti caratteri ben differenziati.

Per brevità non si riportano i dati sperimentali che si riferiscono ai consueti rilievi morfologici, culturali e biochimici eseguiti su ciascun stipite al fine di stabilirne la diagnosi. Diremo soltanto che gli acidificanti riscontrati, appartengono nella grande maggioranza dei casi, alle *Coccacee*. Le specie identificate sono le seguenti: *Streptococcus lacticus* Kruse, *Micrococcus lactis acidi* Marpmann.

Fra le *Bacillaceae* abbiamo trovato un'unica forma ben definita, riferibile (nonostante qualche piccola differenza nei caratteri culturali) alla specie *B. Bulgaricum* Lürssen e Kühn.

Il gruppo degli acido-proteolitici è rappresentato dalle specie *Mammococcus* II Gorini (17) sin. (*Micrococcus acidi lactis liquefaciens* Krüger) e *Micrococcus casei acido-proteolyticus* I Gorini (18) (*M. caseolyticus* Evans).

Alcuni stipiti di attivi proteolitici, possono essere riferiti con sicurezza alla specie *B. mesentericus vulgatus* Flügge.

Data la speciale importanza che gli ifomiceti hanno nel processo di maturazione del quartirolo di monte, importanza che, come si è già detto, è stata rilevata anche dai pratici che si interessano di questo formaggio, abbiamo creduto opportuno soffermarci piuttosto a lungo nel loro studio. Gli schizomiceti ed i lieviti trovati nel quartirolo di monte non differiscono infatti, sia per le specie presenti che per la loro distribuzione durante il periodo di maturazione, da quelli dei più comuni formaggi molli. La tipicità del quartirolo di monte deve essere quindi attribuita essenzialmente all'azione degli ifomiceti.

## FLORA IFOMICETICA

Lo studio delle muffe che compaiono sul quartirolo di monte, si è svolto su diversi stipiti prelevati con le consuete norme batteriologiche da molti campioni a diverso stadio di maturazione. Tutti gli isolamenti compiuti, salvo due che diedero culture pure di *Penicillium candidum* Roger, hanno dato luogo a culture pure di una muffa sviluppatasi in un primo tempo con la formazione di ciuffetti di color bianco, con diramazione a raggera che danno luogo, dopo quattro-cinque giorni, ad un sottile feltro di densità uniforme che assume (cominciando dal centro), un color giallo rosato e diviene rosso mattone cupo dopo altri quattro-cinque giorni.

#### *ASPETTO MICROSCOPICO*

Esistono piccole differenze tra la muffa prelevata dal formaggio e quella coltivata sui terreni di laboratorio.

Il prelievo dal formaggio, mette in evidenza un micelio di dimensioni piuttosto variabili; irregolare (in un punto più largo ed in un altro più stretto), qualche volta sub-dicotomo, settato qua e là, raramente e leggermente colorato in giallo chiaro.

I conidi stanno attaccati in catenelle agli apici dei rami miceliari, che nel tratto che precede la catenella presentano spesso degli ingrossamenti a forma più o meno regolare, senza separazione di setti, quasi ne fossero abbozzi non ancora o non ben sviluppati. La maggior parte dei conidi maturi ha forma rotonda; taluno reca una piccola appendice rettangolare che rappresenta probabilmente un residuo del micelio dal quale proviene. Essi presentano un contenuto protoplasmatico di color giallo, più accentuato al centro, con granulazione intensamente colorata. I conidi non maturi hanno forma più allungata. Le catenelle conidiche sono qualche volta dicotome. Nel punto dove si staccano i due rami si ha spesso un conidio di forma diversa dagli altri, grossolanamente triangolare.

L'esame microscopico eseguito su culture provenienti da agar latte dopo 6, 11 e 30 giorni ha mostrato le solite ife di dimensioni più o meno irregolari, con diramazioni laterali, qualche volta sub-dicotome e poco settate. Le catene dei conidi sono invece leggermente diverse: i conidi hanno forma molto più irregolare, prevalentemente rotondeggiante, alcuni grossi, altri più piccoli, molti allungati; spesso nei primi stadi della moltiplicazione hanno forma rettangolare.

Su patata il micelio è distintamente più colorato in giallo chiaro nel suo contenuto interno; codesta tinta aumenta d'intensità man mano che le ife invecchiano. Si notano inoltre qua e là, piccole porzioni a contenuto più intensamente colorato. Si può dire, in linea generale che, coltivata su terreni solidi, la muffa assume molto rapidamente il suo caratteristico colore rosso-mattone e dà abbondante sporificazione; coltivata in terreni liquidi, assume invece quasi sempre un colore chiaro ialino, e presenta pochissimi conidi.

#### *MISURAZIONI*

È stato misurato il diametro dei conidi maturi e del micelio, sia della muffa naturale da formaggio, che di culture di 15- 30 e più giorni, in agar latte, patata, agar malto, brodo malto e brodo comune.

Il diametro del micelio si è rivelato eguale nei vari substrati; in media è di 3,84  $\mu$ . Il diametro medio dei conidi varia invece di alcuni  $\mu$  più piccoli sono quelli su agar latte, agar malto, brodo malto e brodo comune, in media  $\mu$  10 con un minimo di  $\mu$  7,68 ad un massimo di  $\mu$  15,56; più grandi quelli da culture naturali da formaggio e su patata: in media  $\mu$  12,49, con un minimo di  $\mu$  10,24 ed un massimo di  $\mu$  16,36.

#### COLORABILITÀ

La colorazione con Sudan III che mette in evidenza i grassi, ha dato un risultato nettamente positivo. La colorazione del protoplasma con il blu di Poirrier 0,5 % ed al lattofenolo di Amann, ha dato netta colorazione del contenuto dei conidi ed anche, leggermente, della membrana. Si è potuto osservare così che i conidi giovani hanno membrana sottile, che si ispessisce man mano che se ne ha l'invecchiamento.

#### GERMINAZIONE DELLE SPORE

I conidi germinano in latte digerito Arnaudi, a temperatura ambiente di circa 20°-25° C. entro 48 ore. La parete del conidio si rompe in un punto qualsiasi e da qui inizia la germinazione di un sottile filamento ialino di calibro piuttosto piccolo ed uniforme, che si mantiene non settato finchè non ha raggiunto una certa lunghezza. Il conidio può germinare anche in due punti. Molto spesso il tubetto germinativo è cortissimo (lungo presso a poco come la spora) e si divide subito in due rami secondari.

Dopo altre 24 ore le estremità dei tubetti germinativi, che si sono un po' allungate, si sono anche ingrossate e presentano qualche setto. Cominciano ad aversi allora i primi conidi di forma un po' ovoidale e le prime rudimentali ramificazioni secondarie.

#### CLASSIFICAZIONE

Basandoci sull'osservazione microscopica possiamo così riassumere i caratteri salienti della muffa:

Cespuglietti piatti d'aspetto vellutato, confluenti; di forma rotondeggiante, in principio di color bianco, poi di color rosso mattone cupo e che invecchiando assumono l'aspetto di croste; ife leggermente colorate nel loro interno in giallo chiaro e di diametro un po' irregolare con qua e là rami secondari e diramazioni quasi sub-dicotome, alcune delle quali sterili, altre portanti numerosi conidi in catenelle; diametro medio delle ife 3,84  $\mu$ ; giovani conidi di forma rotondeggiante piuttosto allungata, spesso quasi rettangolare a spigoli arrotondati; conidi maturi, colorati internamente in rosa-giallo con: diametro medio di  $\mu$  12,49 (da formaggio) e di  $\mu$  10 (in terreni culturali artificiali); conidi che a maturità si staccano dalle catenelle.

Queste caratteristiche corrispondono a quelle dell'*Oospora crustacea* (Bull.) Sacc.

Ne riportiamo la descrizione della *Sylloge Fungorum* di P. A. Saccardo (vol. IV, 1886, pag. 20).

« *Caespitulis orbicularibus, sparsis, velutiniis, confluentibus, amoene miniatis, senectute crustaeformibus; hiphis sterilibus repentibus ramosque fertiles furcatis producentibus, 120-150=10; conidiis cuboideis v. cuboideo-globosis, 6-8  $\mu$  diam., miniato-rubris longe catenulatis denique secedentibus. « Hab. in caseo vetusto, in canceribus, piscibus, inque tela adhaerente putrescentibus, in colla putri in Italia, Gallia, Britannia et Germania »;*

All'infuori della leggera differenza del diametro dei conidi c'è concordanza nelle due descrizioni. Quindi la muffa da noi studiata viene senz'altro classificata come *Oospom crustacea* (Bull.) Sacc. (\*).

Questo fungo è già stato segnalato in Lombardia fin dal 1879 da Pirota e Riboni che ne diedero una descrizione piuttosto sommaria e lo identificarono con *Oidium rubens* Link, raccogliendone poi la più vecchia e nuova sinonimia che è pure riportata in gran parte dal Saccardo. Uno studio più dettagliato è stato eseguito dal Beauverie, sotto la denominazione *Oospora crustacea* Saccardo e come sinonimi *Aegerita crustacea* De Candolle 1805, *Mucor crustaceus* Bull. 1791, *Oidium Rubens* Link 1809, *Torula casei* Corda 1838. Questo A. dà un'accurata descrizione morfologica e culturale della muffa e dice di averne trovato anche i periteci (*Choetonium Oospora*). I caratteri dei nostri stipiti non concordano completamente con quelli dati dal Beauverie, specialmente nei riguardi della colorazione rossa che questo Autore dice legata alla presenza di batteri o lieviti che si svilupperebbero contemporaneamente sul formaggio, mentre — come abbiamo più volte detto — la muffa presenta la tipica colorazione rosso-mattone, che si accentua con l'età anche nelle culture sicuramente pure.

Inoltre, dal nostro fungo non abbiamo mai ottenuto, come già Pirota e Riboni, una forma ascofora, nemmeno coltivandolo sopra i substrati indicati dall'autore francese. Nell'incertezza abbiamo voluto eseguire un confronto diretto con una cultura inviataci dal Centralbureau voor Schimmelcultures di Baarn, con la denominazione di *Oospora crustacea*, coltivando tanto i nostri stipiti, quanto quello di Baarn, sui terreni culturali usati dal Beauverie (patata, carota, pane, brodo di prugne ecc.) oltre ai comuni terreni culturali.

Complessivamente le due muffe non sono identiche, ma quasi. Macroscopicamente le uniche differenze riscontrate sono queste: su agar comune e malto inclinati, l'*Oospora* di Baarn, pur avendo lo stesso portamento, cresce più stentatamente della nostra muffa ed assume, non il color rosso mattone caratteristico, ma un colore rosa mattone molto più chiaro. Si è passati poi alla osservazione al microscopio dell'una e dell'altra muffa su tutti i terreni culturali e si è misurato il diametro del micelio e dei conidi.

Nei terreni dove esiste una differenza macroscopica, microscopicamente non se ne ha alcuna; soltanto in due terreni (la patata ed i pezzi di pane umido) sui quali le due muffe appaiono assolutamente eguali, abbiamo notato una certa disuguaglianza. Infatti, su patata l'*Oospora* di Baarn presenta conidi della solita forma, ma molto più piccoli: hanno in media il diam. di 5,6  $\mu$ . contro il diametro di  $\mu$ . 12,5 rivelato dalla nostra muffa su patata. Su pane, l'*Oospora* di Baarn ha i conidi di forma tendente alla quadrata con un diametro medio di 5,3  $\mu$ , contro un diam. di 12,5 della nostra. Il diametro

---

(\*) Al ch.mo Prof. L. Montemartini che ci ha dato suggerimenti intorno alla bibliografia di questa muffa, porgiamo i nostri vivi ringraziamenti.

delle ife, invece, corrisponde. Queste sono le sole differenze, poiché in tutti gli altri terreni culturali, si osservano microscopicamente le stesse forme e le stesse dimensioni. Causa delle dimensioni ridotte dei conidi dell'*Oospora* di Baarn potrebbe essere una maggiore attitudine alla sporificazione, con conseguente diminuzione del diametro per la maggior parte dei conidi stessi. Infatti, su pane, le catene dei conidi sono molto più lunghe di tutte quelle osservate per la nostra muffa.

## OSSERVAZIONI CULTURALI E BIOCHIMICHE

In vista della importanza che ha l'*Oospora crustacea* nella maturazione del *Quartirolo di monte* abbiamo ritenuto interessante precisare maggiormente il comportamento culturale e biochimico del micete; soprattutto rispetto a quei fattori ambientali che possono essere messi in relazione con il processo di maturazione.

### COMPORAMENTO RISPETTO ALLA TEMPERATURA

Si è saggiata la facoltà di sviluppo della muffa a diverse temperature. Essa è stata seminata in provette di latte ed agar-latte e tenuta alle seguenti temperature:  $-9 \div 0$ ;  $0 \div +5$ ;  $15 \div 17$ ;  $22 \div 24$ ;  $30$  e  $37^\circ$  C. Dopo 3 giorni si sono cominciati a vedere piccolissimi ciuffetti di muffa bianca, alle temperature di  $15 \div 17$  e  $22 \div 24^\circ$  C.; sempre alla stessa temperatura, dopo 6 giorni, ottimo sviluppo del sottile feltro rosso. Alle altre temperature nessun cenno di sviluppo anche dopo parecchio tempo (16 giorni).

### CARATTERI CULTURALI

Dopo 10 giorni a  $25^\circ$  C. sono stati rilevati i seguenti caratteri culturali:

*Agar malto inclinato*: feltro bene sviluppato, più rilevato nella parte centrale, uniforme in superficie, di color rosso mattone chiaro.

*Agar latte inclinato*: feltro ottimamente sviluppato, uniforme in superficie, di color rosso mattone chiaro.

*Patata (tassello)*: feltro ottimamente sviluppato ed esteso, non uniforme, ma piuttosto irregolarmente increspato in superficie, di color rosso mattone cupo.

*Carota (tassello)*: feltro ottimamente sviluppato ed espanso, non uniforme e liscio in superficie ma con la parte centrale tutta ricoperta di tante piccole escrescenze alte circa 1-1,5 mm. e formate da piccoli fasci di ife, più o meno parallele. Il colore è ovunque, il solito rosso mattone intenso.

*Pane (pezzetti umidi)*: discreto sviluppo di un feltro liscio uniforme di color rosa mattone, che ricorda in tutto il corrispondente su agar latte.

*Soluzione all'1% di peptone*: la muffa nata in sommersione dà ciuffetti ben espansi, con ife disposte regolarmente a formare quasi una mezza sfera, di color bianco ialino, che tende leggermente ad ingiallire nella parte cen-

trale di sviluppo. In superficie, la muffa presenta un piccolo feltro di color rosso mattone.

*Soluzione all'1 % di glucosio:* la muffa si presenta allo stesso modo come nel liquido all'1 % di peptone.

*Soluzione all'1 % di peptone + 1,8 % di Na Cl:* si presenta in tutto come nel liquido all'1 % di peptone.

*Brodo di prugna al 10 %:* in sommersione, piccoli ciuffetti densi, formati da grovigli irregolari di ife; di colore leggermente tendente al marrone chiaro.

*Brodo gruiera al 10 %:* in superficie un feltro abbondante alto circa 1-1,5 cm. del solito colore rosso mattone. La parte inferiore del feltro, cresciuta in sommersione, essa pure bene sviluppata, ha colore più chiaro.

#### ATTIVITÀ BIOCHIMICHE

Provette di brodo peptonato, idrati di carbonio 2 % e tornasole vengono seminate con l'*Oospora crustacea*. Gli idrati di carbonio saggiati sono: glucosio, levulosio, lattosio, maltosio, galattosio, saccarosio, raffiniosio, arabinosio, glicerina ed amido. Dopo 2 giorni a  $18 \div 21^\circ \text{C}$ . la muffa di color biancastro si comincia a sviluppare in tutti i liquidi, sul fondo delle provette. Si nota una evidente acidificazione soltanto col levulosio ed il lattosio.

Dopo altri 4 giorni, la muffa si è sviluppata ottimamente in tutti gli zuccheri. Buona acidificazione del levulosio e del lattosio. Lievissima quella degli altri.

#### REAZIONE DEL MEZZO

1°) Determinazione della variazione della concentrazione idrogenionica su latte. La muffa è stata seminata in latte tenuto a  $18-21^\circ \text{C}$ . Si sono prelevate sterilmente di tempo in tempo, piccole quantità di latte determinando in queste, le modificazioni del Ph.

Dopo 3 giorni dalla semina, la muffa ha cominciato a svilupparsi, dando luogo ad un sottilissimo feltro biancastro sulla superficie del latte. Dopo altri 2 giorni, il feltro si è fatto più spesso, assumendo una tinta rosso-giallastra. Il latte formava un coagulo molto molle che in alto, immediatamente al di sotto del feltro di muffa, cominciava ad essere digerito per circa 0,5 cm. di spessore, eliminando un liquido di colore giallo piuttosto tendente al bruno. La digestione è proceduta lentamente, dall'alto verso il basso, facendo scomparire il coagulo in circa 18-21 giorni. Il pH del latte è rimasto inalterato fino alla formazione del coagulo, con susseguente digestione (vedi tabella N. 4).

2°) Prova iniziale in mezzo alcalino ed in mezzo acido (a  $18-21^\circ \text{C}$ ). Sono state allestite provette di latte digerito Arnaudi (il cui pH è di solito di 6,6-6,8), con aggiunta di diverse quantità di idrato sodico e di acido lattico, in modo da ottenere dei pH intermedi tra 4,4 e 7,8.

TABELLA IV

| Dopo 3<br>giorni | Dopo 5<br>giorni | Dopo 10<br>giorni | Dopo 20<br>giorni | Dopo 107<br>giorni |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| pH 6,65          | 6,90             | 7,20              | 7,85              | 8,9-9              |

Il latte di partenza e di controllo aveva un pH di 6,65.

La prova è stata eseguita con 4 provette per ciascun pH.

I risultati sono raccolti nella tabella N. 5.

Raffrontando i dati della acidità più bassa alla quale la muffa può vivere e che è praticamente di 5,4 (perchè a pH inferiore essa vegeta troppo stenta-

TABELLA V

| pH di<br>partenza | Sviluppo dopo<br>4 giorni                             | Sviluppo dopo<br>8 giorni  | Sviluppo dopo<br>25 giorni                                      | pH dopo<br>25 giorni |
|-------------------|---|--|---|----------------------|
| 4,4               | —   | —  | —   | 4,3                  |
| 4,55              | —   | —  | —   | 4,6                  |
| 4,7               | —   | —  | velo rosa-giallo quasi invisibile in superficie                 | 4,7                  |
| 5,05              | —   | —  | idem  | 5,1                  |
| 5,2               | —   | piccolissimo ciuffo di muffa sul fondo della provetta            | sottilissimo velo in superficie e lieve deposito sul fondo      | 5,4                  |
| 5,4               | piccolissimo ciuffo di muffa sul fondo della provetta | piccolo feltro rosso in superficie e deposito limitato sul fondo | discreto sviluppo in superficie e deposito limitato sul fondo   | 6,6                  |
| 5,7               | idem  | discreto feltro rosso in superficie                              | in superficie e sul fondo, rigoglioso sviluppo del feltro rosso | 8,1                  |
| 5,8               | idem  | idem   | idem  | 8,3                  |
| 6,1               | idem  | idem   | idem  | 8,3                  |
| 6,4               | discreto ciuffo di muffa sul fondo della provetta     | spesso feltro in superficie e rigoglioso deposito sul fondo      | idem  | 8,3                  |
| 6,6               | idem  | idem   | idem  | 8,4                  |
| 6,9               | idem  | idem   | idem  | 8,4                  |
| 7,2               | idem  | idem   | idem  | 8,6                  |
| 7,5               | idem  | idem   | idem  | 8,6                  |
| 7,8               | idem  | idem   | idem  | 9,0                  |

tamente), con quelli dell'acidità del formaggio nei vari stadi di maturazione (che sono i seguenti: a 6 giorni pH 5,5; a 15 giorni pH 5,8; formaggio maturo pH 6,3), si rileva una netta corrispondenza; vale a dire che dopo 6 giorni, la muffa trova un grado di acidità che ne permette lo sviluppo. Ciò è confermato anche dal fatto che è appunto dopo 6-15 giorni, che la muffa si ricopre della caratteristica muffa.

*RESISTENZA DELLA MUFFA ALLA PRESENZA DI DIVERSE PERCENTUALI DI Na Cl.*

(Latte+ NaCl nella misura del 0,1 - 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 %). Temperatura: 18-21° C. in doppia prova.

Nei primi 12 giorni, non si nota alcuna differenza fra i controlli e le prove con sale fino al 12 %: si ha cioè un sottile feltro di muffa che ricopre tutta la superficie libera del liquido e, immediatamente al di sotto, la digestione per circa 1 cm del latte che ha formato un coagulo mollissimo. L'unica differenza sta nel fatto che la zona di digestione sembra più rilevante che nei controlli, in quanto raggiunge lo spessore di circa 1 cm nelle prove al 3-4 e 5 % di sale. Nelle prove al 13-14 e 15 % si osserva soltanto un sottilissimo velo in superficie, che si fa sempre più sottile quanto più aumenta la percentuale di sale, mentre il latte non è coagulato.

Dopo 22 giorni nelle prove con sale, fino al 5 % compreso, si ha lo stesso aspetto che nei controlli: colore rosso e spessore discreto del feltro (circa 1 cm); nella porzione immediatamente al di sotto, digestione del latte coagulato per circa 3 cm. Nelle prove con il 6-12% di sale, si ha un feltro meno spesso ed una digestione del coagulo che raggiunge soltanto cm 1,5. Il 13-15% di sale dà luogo a feltro sottile e stentato, di color bianco giallastro; il latte è coagulato ma non si ha alcun accenno di digestione. Dopo 94 giorni, non si nota alcuna differenza fra controlli e prove fino all'8 %; si ha cioè un feltro molto spesso (circa 2 cm) di color rosso cupo; il latte è quasi completamente digerito salvo 0,5 cm di coagulo spappolato sul fondo. Le prove al 9 e 10% danno un feltro dello spessore di 1,5 cm circa (cioè leggermente meno spesso del controllo) di colore rosso cupo. Il coagulo è digerito, salvo un deposito al fondo, di circa 1 cm. Con l'11 % di sale il feltro si presenta ancora di colore rosso cupo ma dello spessore di 1 cm circa; il coagulo è digerito, eccettuato un deposito di circa 2 cm; il liquido di digestione ha un colore leggermente più chiaro dei precedenti. Il 12 % di sale dà un comportamento eguale in tutto alla prova precedente, salvo il colore del liquido di digestione che è ancora più chiaro. Col 13 e 14 % di sale si ottiene un feltro di color bianco giallastro; il coagulo, mollissimo, è digerito soltanto nella parte superiore, per circa 2 cm. Il 15 % di sale dà feltro sottile, bianco con bordi giallastri e coagulo mollissimo, digerito in alto per circa 1 cm soltanto.

Riassumendo si può dire che la muffa resiste fino al 15 % di sale, sviluppandosi sempre più lentamente, man mano che ne aumenta la percentuale.

La digestione, che in un primo tempo procede come velocità e quantità

alla stessa maniera nei controlli e nelle prove fino al 5 % compreso, prosegue sempre più rallentata fino al 15 % di sale; in un secondo tempo, cioè dopo 3 mesi, è uguale nei controlli e nelle prove contenenti fino all'8 % di sale; dal 9 al 15 % si ha una diminuzione sensibile e graduale.

*RICERCHE SULLA PROTEOLISI DEL LATTE, IN PRESENZA DI SALE*

È stata eseguita la ricerca degli aminoacidi col metodo del formolo secondo Schiff e Sorensen su alcune delle culture precedentemente descritte di 94 giorni. Il metodo usato è stato il seguente: prelevati 10 cc di liquido e filtrato per carta, venivano neutralizzati perfettamente con  $H_2SO_4$  0,1 N in presenza di fenoltaleina; si aggiungevano 20 cc di formolo neutralizzato (1 parte di formaldeide + 2 parti di acqua), si agitava e si lasciava in riposo qualche tempo. Si aveva allora una acidificazione per la soppressione delle funzioni basiche degli aminoacidi, poichè restavano liberi soltanto i gruppi carbossilici di questi. Si ripristinava ancora l'alcalinità, titolando con Na OH 0,1 N. Il numero di cc. di Na OH 0,1 N necessari alla neutralizzazione costituisce l'espressione dei gruppi  $NH_2$ . La proteolisi viene quindi espressa in cc. di Na OH 0,1 N. Per ogni percentuale sono state eseguite cinque prove: i dati sotto riportati ne rappresentano la media:

TABELLA VI

| % di Na Cl | cc di Na OH<br>0,1 n |
|------------|----------------------|
| 0,1        | 21,2                 |
| 1          | 22,4                 |
| 2          | 19,5                 |
| 3          | 19,1                 |
| 5          | 17,5                 |
| 7          | 16,6                 |
| 9          | 14,2                 |
| 11         | 14,0                 |
| 12         | 13,4                 |
| 13         | 12,0                 |
| 15         | 10,5                 |
| controllo  | 19,2                 |

Da questi dati parrebbe risultare che le piccole quantità (0,1 e 1 %) di sale, danno quasi un incremento della proteolisi, mentre le superiori, (oltre il 3 %), determinano invece una depressione.

#### PIGMENTO

Il pigmento lo si estrae dal feltro cresciuto su patata e su agar-latte. L'estrazione riesce con acqua, alcool etilico, alcool amilico, cloroformio, etere, acetone, xilolo, benzolo. Il pigmento non è solubile in etere di petrolio. In alcool etilico, alcool amilico, acqua e acetone la soluzione ha color aranciato, intenso nei primi due solventi, meno intenso nei due ultimi. In cloroformio e in etere il colore è meno carico e giallo citrino. In xilolo e benzolo la solubilità è minore e la colorazione giallo chiaro. La soluzione acquosa trattata con piccole quantità di carbonato sodico e di acido acetico non cambia l'intensità del colore, che è stabilissimo. Dalla soluzione acquosa filtrata e posta in capsula a bagnomaria, è stato ottenuto il residuo secco nel quale il pigmento permane, poichè si ridiscioglie nei medesimi reagenti, come la prima volta.

#### CONCLUSIONI

Dal complesso delle osservazioni compiute si può concludere che la maturazione del *Quartiolo di monte* nella fase iniziale è determinata essenzialmente da un processo di acidificazione dovuto, in massima parte, a streptococchi lattici; in un secondo tempo si inizia l'idrolisi della caseina ad opera di microbi acido-proteolitici del Gorini e dei comuni proteolitici. Questo processo digestivo viene quindi proseguito dall'*Oospora crustacea* (Bull.) Sacc. che, largamente diffusa sulla superficie del formaggio, penetra anche nell'interno delle forme determinando una progressiva digestione dall'esterno verso l'interno. Questo andamento di maturazione conferisce al *Quartiolo di monte* netti caratteri di tipicità nei riguardi del sapore, nonchè un aspetto caratteristico dovuto a chiazze rossastre d'aspetto crostoso che l'*Oospora crustacea* determina alla superficie delle forme.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Verf. studiert mit bakteriologischen, mikroskopischen und chemischen Prüfungen den Reifungsprozess des Käses *Quartiolo di monte*. Er erbringt den Nachweis der Mikrobenarten (Milchstreptokokken, Säure-proteolytische und proteolytische Bakterien) die in den aufeinanderfolgenden Phasen der Reifung den Vordergrund behaupten, und schreibt die besondere Charakteristik dieser Käseart der *Oospora crustacea* (Bull) Sacc. zu, deren kulturelle Merkmale, Resistenz gegen NaCl und proteolytische Wirkung eingehend erforscht werden.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) *Musso G. e Menozzi A.* - Ricerche sulla composizione degli stracchini. « Ann. della Staz. Sperim. di Caseif. Lodi », 1877-89, pag. 195.
- (2) *Maggiore-Vergano A.* - Sulla composizione dei caci stravecchi. « Riv. d'Igiene e Sanità Pubblica », 1891, pag. 669.

(3) *Samarani F.* - Culture selezionate del *Penicillium glaucum* per la produzione del verde del Gorgonzola. « Ann. della Staz. Sperim. di Caseif. Lodi », 1909.

(4) *Arnaudi C.* - Sui Penicilli del Gorgonzola. « Boll. dell'Ist. Sieroterapico Milanese », febbraio 1927.

(5) *Arnaudi C.* - Ueber die Penicillien des Gorgonzolakäses. « Centr. Bakt. II Abt. », Band 73, 1928.

(6) *De Tamasi* - Untersuchungen über die Mikroflora des Gorgonzolakases « Centralb. Bakt. II Abt. » Band. 74, pag. 184.

(7) *Bondioli M.* - Contributo allo studio della maturazione dei formaggi erborinati italiani con speciale riguardo al Gorgonzola. « Ann. Ist. Sper. Caseif. Lodi », vol. VI, n. 8-9.

(8) *E. Caseria e I. Erba.* - Ricerche sulla costituzione chimico-biologica del Gorgonzola in rapporto alla qualità. « Quaderni della Nutrizione », 1936, pag. 472.

(9) *Carini C.* - Ricerche batteriologiche sul formaggio Gorgonzola. « Rend. Reale Accademia dei Lincei », 1906, 15, 298.

(10) *Carini C.* - Ricerche sopra una grave malattia del formaggio Gorgonzola. « R. Acc. Lincei », 1908, 17, 568.

(11) *Carini C.* - Considerazioni igienico-batteriologiche sulla foracchiatura dello stracchino Gorgonzola. « Agricoltura Moderna », 1908.

(12) *Gorini C.* - Affinità di origine e prevenzione di alcune malattie del formaggio Gorgonzola e dei prosciutti. « R. Ist. Lombardo Sc. e Lett. », 1911, 44, 1.

(13) *Pascetti G.* - Sul formaggio di Castelmagno. « Ann. Ist. Sperim. di Caseif. Lodi », ottobre 1927.

(14) *Sacchetti M.* - Contributo alla conoscenza della flora microbica di alcuni formaggi italiani. I. « Arch. f. Mikrob. 3, 650 », 1932, settembre.

(15) *Sacchetti M.* - Contributo alla conoscenza della flora microbica di alcuni formaggi italiani. II. « Arch. f. Mikrob. 4, 427 », 1933.

(16) *Carini C.* - Sulla distribuzione dei batteri nel formaggio grana. « Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett. », serie II, vol. XXXVII, fasc. II, 1904.

(17) *Corberi E.* - Ricerche sopra i cocchi acidoproteolitici del Gorini. « Archiv für Mikrobiologie », IX, 95, 1938; « Rend. R. Ist. Lomb. Sc. Lett. », 71, 265, 1938.

(18) *Carini C.* - Ricerche sui cocchi acido-presamigeni del formaggio (*Micr. casei acidoproteolyticus I e II*). « Rend. R. Acc. Lincei », 19, 150, 1910.

(19) *Pirotta R. e Riboni G.* - Studi sul latte. « Arch. Bot. Critt. », Pavia, vol. II e III, pag. 306, 1879.

(20) *Saccardo P. A.* - « Sylloge Fungorum », vol. IV, pag. 20, Patavii, 1886.

(21) *Beauverie J.* - Études sur le polymorphisme des champignons. « Ann. Univer. de Lyon », fasc. 3, pag. 201, 1900.

---

# Notiziario e attualità di Laboratorio

## UN NUOVO METODO DI COLORAZIONE DELLE CIGLIA BATTERICHE

*F Neri: Osservazioni sull'apparato ciliare degli schizomiceti (Giornale di Batteriologia e immunologia, Vol. XXIV N. 9)*

*L'Autore descrive un nuovo metodo di colorazione che gli ha consentito di confermare l'origine ectoplasmatica delle ciglia batteriche e di mettere in evidenza un singolare apparato ciliare (ciglia arrotolate) in alcuni stipiti mucosi di Salmonelle. La tecnica è la seguente:*

### LIQUIDO FISSATORE-MORDENTE

*a) soluzione satura di sublimato corrosivo;*

*b) soluzione di tannino-allume; 20 gr. di tannino purissimo all'etere si sciolgono a caldo in 100 cc. di acqua distillata, quindi si aggiungono cc. 37 di soluzione satura di allume potassico; tenere per 30' in autoclave ad 1 atm.*

*c) soluzione al 10% di allume ferrico-ammonico violetto.*

*Si mescolano le tre soluzioni nel precedente ordine e nelle proporzioni di 20 : 10 : 10. Il fissatore mordente così preparato dev'essere utilizzato solo dopo 2-3 ore dalla mescolanza delle tre soluzioni e si conserva solo per 24 ore. Al momento dell'uso dev'essere filtrato.*

### SOLUZIONE COLORANTE

*Si sciolgono in mortaio gr. 0,5 di cristal-violetto (Grübler) in 10 cc. di alcool etilico e si aggiungono cc. 90 di acqua di anilina. Si conserva per circa una settimana e deve essere filtrata prima dell'uso.*

### TERRENI

*Particolarmente adatti per lo sviluppo delle ciglia sono l'agar sangue e l'agar all'infuso di rene bovino o di placenta umana; quest'ultimo si prepara nel seguente modo: 200 gr. di rene o placenta finemente tritati si stemperano in cc 1000 di acqua dist. addizionata di 10 cc di KOH N. Si lascia in infusione a 4-5° per 24 ore, si scalda a b.m. bollente per 30', si filtra e si sterilizza. A 900 cc di infuso si aggiungono 100 cc di soluzione conc. Di estratto Liebig (Cirio) (800 cc di acqua + g 112 di estratto, cioè un vasetto + cc 160 di KOH N), g. 20 di peptone Witte, g 5 di NaCl, e g 20 di agar.*

*Colture su agar inclinato con superficie ancora umida; è preferibile impiegare tappi di sughero.*

*Da colture recenti e ben sviluppate si preleva un ansata normale di patina, si stempera cautamente in cc 0,1-0,2 di acqua dist. posta su vetro da orologio; una goccia di questa sospensione va quindi diluita in 3-4 cc di ac-*

qua su un altro vetro da orologio. Si prelevano e si depongono, senza distenderle, ansate normali su vetrini coprioggetti di spess. non superiore a mm 0,15, scrupolosamente puliti (immersione in HCl conc. per 10-15', lavaggi con acqua dist., con NH<sub>3</sub> eone., e nuovi lavaggi con acqua; conservazione in alcool) e passati ripetutamente alla fiamma.

Si lascia asciugare al riparo della luce ed a temperatura ambiente entro scatola Petri con coperchio socchiuso.

Il vetrino col materiale rivolto in basso viene collocato su un vetro da orologio, ove si fa giungere il fissatore-mordente da un imbutino (si fa contemporaneamente la filtrazione), in modo che il vetrino galleggi. Si lascia a contatto per 1 ora; quindi si lava con un getto di acqua dist. e, procedendo come sopra, si colora a caldo per pochi minuti.

Il preparato accuratamente lavato e asciugato per carta e con aria calda, viene montato in balsamo neutro.

\*\*\*

Secondo De Alessi (Giornale di medicina militare, sett. 1938-XVI), ai fini del controllo della pastorizzazione del latte, il miglior metodo è quello della ricerca del colibacillo.

L'efficienza della pasteurizzazione del latte può essere pure controllata mediante la prova della fosfatasi, la quale può eseguirsi per stabilire se il latte abbia raggiunto almeno i 62°,5 per almeno 30' e se al latte pasteurizzato sia stato aggiunto latte crudo in misura superiore al 5 %. Il metodo è stato sottoposto ad un minuzioso controllo qualitativo e quantitativo da D. Parvis (Igiene moderna, agosto 1939), relativamente alla temperatura, alla durata del riscaldamento, alle mescolanze con latte crudo ed anche all'influenza esercitata dalla presenza di sostanze eventualmente aggiunte a scopo conservativo.

\*\*\*

Il pannello di semi di pomodoro, quale mangime per le vacche da latte è stato oggetto di studio da parte di Dalla Torre, Busico, Canaletti, Viola. (Annali dell'Ist. Cas. Zoot. per il Mezzog. in Caserta, 1932, Vol II). Il valore nutritivo è di 90-95 U. F., l'appetibilità discreta; il contenuto microbico è costituito principalmente da batteri aerobi sporigeni proteolitici; sono presenti pure, ma in proporzioni relativamente assai esigue, i fermenti butirrici.

I caratteri organolettici del latte non vengono influenzati nemmeno in seguito ad abbondanti somministrazioni. La crema risulta però poco colorata; così pure il burro il quale, specialmente nella stagione calda, presenta anche una minor consistenza. La produzione di formaggi molli, di pasta filata e cotti non risente alcuna influenza degna di rilievo nei confronti con quella degli stessi formaggi prodotti con latte proveniente da vacche alimentate con una miscela di crusca-panello di arachide.

I. POLITI



**BANCO DI SICILIA**  
ISTITUTO DI DIRITTO PUBBLICO

**122 SEDI E AGENZIE**

L'ISTITUTO RACCOGLIE  
DEPOSITI A RISPARMIO  
E IN C/C FRUTTIFERO  
E COMPIE TUTTE LE  
OPERAZIONI DI BANCA

**OLTRE MEZZO MILIARDO  
DI FONDI PATRIMONIALI**

**BANCO DI ROMA**  
BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

SOC. AN. CAPITALE E RISERVE LIT. 347.774.437,84  
ANNO DI FONDAZIONE 1880

SEDE SOCIALE E DIREZIONE CENTRALE IN  
**ROMA**

170 Filiali in Italia, in Libia e nell'Egeo - 16 Filiali nell'Impero - 18 Filiali e 3 Uffici di rappresentanza all'Estero

**TUTTE LE OPERAZIONI DI BANCA**

**SPAZIO  
DISPONIBILE**



---

# **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-  
stiame 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

---