

# 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

AGOSTO 1941 - XIX

VOL. I - FASC. V

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 tedesco o inglese. 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 di 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	decimetro = dm	litro = l	per mille = ‰
ettogrammo = hg	centimetro = cm	centimet cubo = cc	normale = N
grammo = g	millimetro = mm	ora = h	decimo norm = 0,1 N
decigrammo = dg	micron = $\mu$	minuto primo = min	ph, Ph ecc. = pH
centigrammo = cg	metro quadr. = mq		
milligrammo = mg			
millesimo di =			
y grammo		minuto se- = sec	
	centim quadr = cmq	condo	
metro = m	millim quadr = mmq	per cento = %	

(tutti questi segni sempre senza punto)

Le formule chimiche devono essere scritte con gli indici in basso. Es.  $\text{CaCl}_2$

---

## SOMMARIO

I. POLITI - Ricerche sui fermenti lattici (Nota II)	pag. 213
O. VERONA - Sulla presenza di Protozoi nelle colture di microbi cellulolitici	» 225
E. EMILIANI - Sulla fermentazione alcoolica del succo di sorgo zuccherino	» 228
O. VERONA - Due nuove specie di cellulolitici aerobi	235
S. RICCARDO - Sulla macerazione biochimica della « <i>Ampelodesma mauritanica</i> »	
Dur. e Schinz, e sull'azione dei microbi alcali tolleranti nella preparazione di paste cellulolitiche	» 240

---

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. 165.000.000 .

BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

# **CREDITO ITALIANO**

BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

S. A. CAPITALE L. *500.000.000*

RISERVA L. 123.394.040

SEDE SOCIALE: GENOVA

DIREZ. CENTRALE: MILANO

**OGNI OPERAZIONE E  
SERVIZIO DI BANCA**

## **Ricerche sui fermenti lattici (nota II)**

**Dott. I. Politi** (Vice-direttore)

*(Ricevuto il 10 Dicembre 1940-XIX)*

### OSSERVAZIONI SULLO SVILUPPO IN LATTE DI ALCUNI FERMENTI LATTICI

Le ricerche di cui segue l'esposizione fanno parte di una serie di indagini sistematiche, intraprese da questa Stazione sul complesso problema delle molteplici influenze che diverse condizioni, e specialmente il tipo di alimentazione degli animali, esplicano sul contenuto microbico e sulle attitudini casearie del latte. Esse recano un preliminare contributo alla conoscenza di alcune caratteristiche fisiologiche dei fermenti lattici in rapporto alla normale costituzione del latte ed alle variazioni che si possono verificare nelle attitudini fermentative di questo.

È noto quanto siano diverse la rapidità e l'intensità di sviluppo dei vari fermenti lattici nel latte e, parallelamente, la rapidità e l'intensità dell'acidificazione da essi determinata. Infatti, mentre alcuni di questi microrganismi trovano nel latte condizioni di sviluppo particolarmente favorevoli, acidificando con grande rapidità e coagulando la caseina in meno di 24 ore, altri fermenti lattici crescono assai più lentamente, coagulando solo dopo due-tre giorni ed altri ancora non sono suscettibili che di assai scarsa crescita, lasciando il latte immutato o determinandovi solo una leggera acidificazione. Alcuni di questi ultimi microrganismi sono in realtà incapaci di fermentare il lattosio, ma non mancano fermenti lattici che, pur dotati di questa proprietà, crescono più o meno stentatamente nel latte. Del resto le ricerche compiute recentemente sui fermenti lattici dei foraggi insilati (1) hanno consentito di accertare che la stentata crescita in latte è una caratteristica molto generale di codesti microrganismi, indipendentemente dalla loro posizione sistematica.

Ma anche estendendo l'osservazione ai fermenti lattici di altri substrati naturali si rileva facilmente che le caratteristiche dello sviluppo in latte sono spiccatamente variabili. Le cause di codeste differenze di comportamento si ricollegano quindi a proprietà fisiologiche indipendenti dalla capacità di fermentare il lattosio e non ancora sufficientemente precisate.

Recenti ricerche hanno posto in luce le speciali esigenze che i fermenti lattici presentano sia nei riguardi della loro nutrizione azotata (2) sia anche nei riguardi di particolari fattori di accrescimento e stimolanti (3). Riesce agevolmente quindi considerare sotto questi aspetti le caratteristiche di sviluppo dei vari fermenti lattici e attribuirne le differenze di comportamento in latte alle loro eventuali diverse esigenze di nutrimento azotato o di fattori di accrescimento. È pure necessario osservare in proposito che il latte costituisce un substrato ricco di azoto organico, ma per la quasi totalità sotto forma di sostanze proteiche complesse e colloidali, la cui assimilazione

non può aver luogo se non in seguito ad un processo d'idrolisi. Ne deriva che importanti differenze di comportamento possono essere dovute ad una diversa capacità di idrolizzare le proteine del latte.

È agevole ora comprendere che più complete e sicure conoscenze intorno alle attitudini fisiologiche dei vari fermenti lattici consentirebbero anche una più precisa conoscenza delle caratteristiche del latte, considerato come substrato della fermentazione acida cui soggiace spontaneamente ed in particolar modo nei diversi processi di trasformazione casearia.

E perciò, in vista di più ampie ricerche sul complesso argomento, si è ritenuto utile compiere alcune indagini preliminari e di esse si espongono in questa nota i risultati.

Per queste ricerche vennero impiegati i seguenti microrganismi:

<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	(da jogurt)
» <i>acidophilus</i>	
» <i>sili</i> (malto) <sup>(1)</sup>	(da foraggio insilato)
» » (latte) <sup>(1)</sup>	
Ceppo 13 B ( <i>Lact. plantarum</i> )	(da foraggio insilato)
<i>Streptococcus lacticus</i> – ceppo 1	(da latte)

Per ciascun ceppo venne controllato il comportamento in latte mediante la misura dell'acidificazione in questo prodotta. A tal fine si procedette nel seguente modo: del latte fresco ed intero venne distribuito in provette e sterilizzato con riscaldamento in autoclave a 110° per 20'; si inocularono quindi i singoli microrganismi, trapiantandoli con piccola ansa di platino da colture di 24 ore, e si mantenne in termostato a 37-38° per i primi cinque ceppi ed a 29-30° per gli altri due. Dopo 17, 24, 42 e 60 ore si fecero sterilmente dei piccoli prelievi e si determinò il pH con il metodo potenziometrico.

I risultati ottenuti <sup>(2)</sup>, riassunti nella Tab. I e riprodotti dal diagramma I, dimostrano le diversità di comportamento. Più che il grado di acidità misurato al termine dell'esperienza, il quale per alcuni ceppi corrisponde od è molto prossimo al più basso valore del pH tollerato dai microrganismi medesimi, è interessante porre a confronto le rapidità di acidificazione. In questo senso si rileva che il più attivo è stato il *Lact. bulgaricus*; un po' meno rapida è risultata l'acidificazione del *Lact. acidophilus*; molto più lenta quella del *Lact. sili*, lentissima quella del ceppo 13 B. Si osserva inoltre una netta diversità fra il *Lact. sili* (malto) e il *Lact. sili* (latte) e ciò dimostra che quest'ultimo ha subito un graduale e sensibile abituamento al substrato latte. Nei riguardi dello *Strept. lacticus* si rileva infine che l'acidificazione è stata dapprima discretamente rapida ma poi si è rallentata fortemente, cosicchè il valore del pH è sceso al di sotto di 5 soltanto dopo le 48 ore.

---

(1) Trattasi dello stesso ceppo, trapiantato periodicamente, da oltre un anno, rispettivamente in brodo malto ed in latte.

(2) Risultati affatto analoghi si sono ottenuti ripetendo le prove di acidificazione con diversi altri campioni di latte.

TAB. I — ACIDIFICAZIONE DEL LATTE

Ceppi	pH-dopo ore			
	17	24	42	60
Lact. bulgaricus	4.45	3.95	3.5	3.4
» acidophilus	4.55	4.05	3.75	3.55
» sili (malto)	6.3	6.15	5.45	4.65
» » (latte)	6.2	5.85	4.5	3.7
Ceppo 13 B (Lact. plantarum)	6.45	6.4	6.3	6.1
Strept. lacticus - ceppo I	5.7	5.45	5.1	4.8

Allo scopo di chiarire le cause delle spiccate differenze di comportamento emerse dai precedenti saggi, ossia nell'intento di accertare se le differenze stesse debbano attribuirsi a diverse esigenze di fattori d'accrescimento o piuttosto a differenti attitudini ad utilizzare le sostanze proteiche del latte, si è pensato di istituire delle prove colturali impiegando un terreno nutritivo il più possibile privo dei detti fattori ma completo come contenuto in sostanze minerali, idrati di carbonio e composti azotati di diretta assimilazione; in modo cioè da poter rilevare l'effetto utile derivante dall'aggiunta di piccole quantità di latte o di siero, in virtù dell'apporto dei fattori di accrescimento contenuti nel latte medesimo. Seguendo codesto criterio si è preparata la seguente soluzione:

Fosfato monopotassico gr. 1; solfato ammonico gr. 0.250; solfato di magnesio gr. 1; cloruro sodico gr. 1; lattosio gr. 20; idrolizzato di gr. 10 di caseina pura (i); acqua distillata sino a 1000 cc.; pH 6,2-6,4. Distribuito in provette (10 cc.) e sterilizzato a mezza atm. per 20'.

Per ciascun ceppo vennero allestite le seguenti prove di acidificazione:

- soluzione nutritiva senza alcuna aggiunta (controllo)
- » » più 1 cc. di siero (2) di latte
- » » » 0,1 cc. di siero di latte
- » » » 1 cc. di latte
- » » » 0,1 cc. di latte.

I risultati ottenuti sono raccolti nelle Tab. III e IV. Dalle prove di controllo emerge che le forme batteriche hanno prodotto un'acidificazione assai esigua; per lo Strept. lattico si è invece osservato uno sviluppo leggermente più intenso, accompagnato da una acidificazione sensibilmente più accentuata; ciò prova che quest'ultimo microrganismo ha minori esigenze di fattori di accrescimento, il che del resto è stato posto in chiara evidenza da Orla Jensen.

Considerando ora l'andamento dell'acidificazione nelle prove con aggiunta di siero (diagr. II), emergono i seguenti rilievi:

(1) G. 10 di caseina pura, addizionati a 100 cc. di  $H_2SO_4$  - 20% vennero riscaldati a b.m. bollente per 2 ore e mezza. Dopo neutralizzazione con barite, filtrazione e la-vaggio del precipitato, il liquido venne addizionato dei sali minerali e del lattosio e diluito con acqua dist. a 1000 cc.

(2) Preparato per precipitazione della caseina con  $H_2SO_4$ , filtrazione, neutralizzazione con NaOH e sterilizzazione in autoclave a mezza atm. per 20'.

Ad eccezione del *Lact. sili*, si osserva che l'acidificazione è stata più rapida ed intensa nelle prove con l'aggiunta di 1 cc. di siero che non in quelle con 0,1 cc.; ciò dimostra l'effetto utile dei fattori di accrescimento contenuti nel siero stesso.

L'acidificazione prodotta dal *Lact. bulgaricus* presenta le stesse caratteristiche di rapidità osservate per questo microrganismo nelle colture in latte.

L'acidificazione del *Lact. acidophilus* procedette dapprima con rapidità alquanto maggiore di quella del *Lact. sili* e del ceppo 13 B; ma poi si attenuò fortemente arrestandosi del tutto a valori del pH di molto superiori a quelli riscontrati al termine dell'esperienza per tutti gli altri ceppi. E poichè si è visto che questo fermento lattico acidifica il latte con rapidità ed intensità assai prossime a quella del *Lact. bulgaricus*, appare evidente che qui lo sviluppo fu rallentato ed arrestato da una vera e propria carenza di qualche sostanza indispensabile.

TAB. II

	+ Siero cc. 0.1			+ Siero cc. 1				
	pH dopo ore			pH dopo ore				
	20	44	66	114	20	44	66	114
<i>Lact. bulgaricus</i>	4,85	4,35	4,25	4,25	4,05	3,8	3,7	3,55
» <i>acidophilus</i>	5,7	5,65	5,6	5,55	5,5	5,15	5,12	5,1
» <i>sili</i> (malto)	6,1	5,75	4,95	3,8	6,1	5,95	5,25	3,85
Ceppo 13 B	5,95	4,75	4,25	4,15	5,75	4,25	3,8	3,55
<i>Strept. lacticus</i>	5,25	4,6	4,45	—	4,15	3,85	3,65	—

TAB. III

	Controllo (nessuna aggiunta) pH dopo ore	+ latte cc. 0.1			+ latte cc. 1				
		pH dopo ore			pH dopo ore				
		19	47	62	15	40	62	15	40
<i>Lact. bulgaricus</i>	6,2	6,15	6,1	5,45	4,2	3,95	4,2	3,5	3,-
» <i>acidophilus</i>	6,2	5,95	5,9	6,05	5,6	5,6	5,7	4,1	3,85
» <i>sili</i> (malto)	6,2	6,15	6,1	6,25	6,05	5,65	6,3	6,15	6,-
» <i>sili</i> (latte)	6,15	6,-	5,85	6,25	5,95	5,2	6,25	6,-	4,9
Ceppo 13 B	6,2	6,1	5,95	6,2	4,8	4,25	6,2	4,9	4,15
<i>Str. lacticus</i>	5,9	5,45	5,3	—	—	—	4,8	3,95	3,8

Il ceppo 13 B, pur acidificando con una rapidità inizialmente minore di quella dei due precedenti, ha abbassato il pH a valori poco discosti da quelli del *Lact. bulgaricus*. È evidente quindi che la lentezza e l'esiguità dell'acidificazione che il ceppo 13 B determina nelle colture in latte non sono imputabili a particolari esigenze di fattori d'accrescimento, ma principalmente ad una spiccata incapacità di utilizzare le sostanze proteiche del latte.

L'acidificazione prodotta dallo *Strept. lacticus* presenta caratteristiche di



rapidità che si accostano alquanto a quelle rilevate per il *Lact. Bulgaricus*. Ciò permette quindi di dedurre che la limitata acidificazione del latte, prodotta da questo streptococco, appare attribuibile ad una limitata capacità di idrolizzare i composti proteici del latte.

Il *Lact. sili* che, come si è visto, acidifica lentamente il latte, anche in queste prove è apparso incapace di più rapida azione; ciò fa supporre che codesta ridotta attività fermentativa, congiunta a lento sviluppo, sia indipendente dalla nutrizione azotata del germe stesso e perciò con molta probabilità imputabile a particolari esigenze di fattori di crescita o di stimolanti.

I risultati ottenuti dalle prove di acidificazione con aggiunta di latte, anziché di siero (diagr. III), confermano le precedenti osservazioni ed in più consentono di rilevare che il *Lact. acidophilus* ha prodotto un'acidificazione alquanto più intensa di quella riscontrata nei saggi precedenti. Questa diversità di comportamento appare determinata dalle sostanze proteiche apportate al substrato col latte aggiunto e dimostra così le speciali esigenze di questo ceppo in fatto di nutrizione azotata, esigenze nettamente superiori a quelle degli altri fermenti lattici esaminati parallelamente.

Nelle prove di acidificazione, di cui si è detto in precedenza, il latte ed il siero addizionati al terreno colturale vennero resi sterili mediante riscaldamento in autoclave per 20' a mezza atm. di sovrappressione. È evidente che con un siffatto trattamento termico alcuni costituenti del latte soggiacciono totalmente o in parte a distruzione, e perciò sorge il dubbio che i risultati delle precedenti esperienze non riflettano esattamente i comportamenti che i microrganismi esaminati avrebbero nel latte crudo. Si è quindi creduto interessante compiere delle prove comparative coltivando i detti microrganismi nel terreno alla caseina idrolizzata addizionato di siero sterilizzato col calore e di siero sterilizzato mediante filtrazione per candela. Non sono emerse rimarchevoli differenze e ciò consente di affermare che, almeno per i cinque ceppi esaminati, il latte non contiene fattori termolabili influenti sul loro sviluppo.

Si è visto che il *Lact. sili*, oltre ad essere scarsamente attivo nel latte, non ha trovato condizioni favorevoli per un rapido sviluppo nemmeno nelle prove di fermentazione di cui si è detto in precedenza e cioè in un substrato contenente azoto direttamente assimilabile e addizionato di siero o di latte quale fonte di fattori di accrescimento. Perciò, al fine di accertare la principale causa di questo comportamento, che è in contrasto con la rapidità di sviluppo e di acidificazione del suddetto germe in substrati ad esso più adatti (succhi ed infusi vegetali), è parso utile compiere ulteriori prove comparative impiegando i seguenti substrati:

Sali minerali - idrolizzato di caseina <sup>(1)</sup> - glucosio 2% + siero di latte sterile per filtrazione amicrobica 10% e 1%.

Sali minerali - idrolizzato di caseina <sup>(1)</sup> - glucosio 2% + infuso di trifoglio <sup>(2)</sup> sterile per filtrazione amicrobica 10% e 1%.

---

(1) Come nelle precedenti prove.

(2) G. 10 di trifoglio secco vennero trattati con 100 cc. di acqua distillata, lasciando in infusione a 45° per 30'.

I risultati ottenuti sono riprodotti dai diagr. IV, V, VI, VII, VIII e consentono di rilevare che l'acidificazione prodotta dal *Lact. sili* e dal ceppo 13 B, fermentando il glucosio in presenza di siero di latte, è effettivamente un po' più rapida di quella rilevata nelle esperienze precedenti nelle quali venne impiegato il lattosio. Però si osserva facilmente che, mentre per il *Lact. bulgaricus* il siero di latte ha agito più favorevolmente, come apportatore di fattori di accrescimento, che non l'infuso vegetale, per lo str. lattico, per il ceppo 13 B e più ancora per il *Lact. sili* si ebbe un risultato opposto. Si può anzi osservare che con l'aggiunta dell'infuso vegetale quest'ultimo germe ha potuto svilupparsi ed acidificare con rapidità notevole e nettamente maggiore della corrispondente del *Lact. bulgaricus*.

Si può quindi concludere che il *Lact. sili* presenta una spiccata sensibilità a qualche fattore stimolante presente nei vegetali e mancante o scarsamente contenuto nel latte.

Il caratteristico comportamento osservato nei riguardi dello Streptococco lattico (limitata acidificazione del latte, rapida ed intensa acidificazione del terreno alla caseina idrolizzata addizionato di piccole quantità di latte o di siero) ha suggerito l'opportunità di esaminare allo stesso modo altri cinque ceppi della medesima specie batterica, tutti isolati da latte inacidito spontaneamente, nell'intento di constatare delle eventuali differenze, degne di rilievo, soprattutto nei riguardi delle attitudini ad utilizzare i composti proteici del latte. L'andamento dell'acidificazione prodotta da questi microrganismi è riassunto dai dati della Tab. IV e dal diagr. IX, donde emergono differenze di comportamento piuttosto accentuate; mentre i ceppi 17 e 12 acidificano in modo analogo al ceppo 1, esaminato con le precedenti prove, e coagulano soltanto dopo 48-60 ore, i ceppi 14, 26 e 8 acidificano più rapidamente e coagulano il latte prima che siano trascorse le 24 ore. Le successive ricerche, compiute mediante il terreno alla caseina idrolizzata, con aggiunte di siero o di latte come nelle precedenti prove, e delle quali per brevità non si riportano i risultati, hanno poi consentito di dedurre che le suddette diversità di comportamento dipendono sia da differenti proprietà proteolitiche, sia anche da altre diversità di attitudini fisiologiche che ulteriori indagini potranno chiarire meglio.

TAB. IV- ACIDIFICAZIONE DEL LATTE PRODotta  
DA ALCUNI STREPTOCOCCHI

				pH dopo ore			
				17	24	42	66
Strept. lattico	ceppo		1	5.65	5.4	5.05	
»	»	»	8	4.6	4.3	4.1	
»	»	»	12	5.8	5.5	5.1	4.9
»	»	»	14	5.3	4.45	4.2	4.15
»	»	»	17	5.7	5.45	5.15	4.85
»	»	»	26	4.95	4.3	4.05	4.05

Si è visto in precedenza che la limitata acidificazione prodotta nel latte da alcuni streptococchi sia da attribuire essenzialmente ad una limitata capacità di idrolizzare le sostanze proteiche del detto substrato. Per confermare questa ipotesi si è fatto crescere lo Streptococco I in latte addizionato di peptone Witte nelle proporzioni di 0.005% - 0.025% - 0.05% - 0.025%. I fattori di accrescimento apportati con queste aggiunte sono evidentemente in quantità trascurabili in confronto a quelle contenute nel latte e perciò l'effetto delle aggiunte medesime è da attribuirsi pressochè esclusivamente al miglioramento della nutrizione azotata. I risultati delle determinazioni compiute sono esposti nella Tab. V e riprodotti dal diagr. X; da essi emerge chiaramente la netta influenza delle aggiunte fatte al latte, compresa quella esiguissima del 0.005%. Risulta così confermata l'importanza che il potere proteolitico, di cui sono variamente dotati i fermenti lattici, presenta nei confronti dello sviluppo in latte dei fermenti medesimi e quindi della rapidità dei processi fermentativi da essi determinati.

TAB. V — ACIDIFICAZIONE DEL LATTE ADDIZIONATO DI PEPTONE WITTE (STREPT. LATTICO CEPP0 I)

<i>Substrato</i>	pH dopo ore		
	17	24	67
Latte	5.85	5.6	4.8
» + peptone 0.005 %	5.6	5.35	4.6
» + » 0.025 %	5.15	4.9	4.2
» + » 0.05 %	4.75	4.15	4.0
» + » 0.25 %	4.25	4.15	3.9

I risultati ottenuti suggeriscono inoltre alcune considerazioni che si ricollegano al contenuto del latte in composti azotati non proteici che diversi Autori hanno dimostrato essere presenti in proporzioni corrispondenti al 5-6% circa dell'azoto totale. Fra questi composti sono stati identificati, in quantità più o meno esigue: urea, aminoacidi, acido orotico, lecitina, purine ecc. Viale (4) ebbe a riscontrare, come media di sette determinazioni, un contenuto di azoto aminico di 0,0086%, oltre che la presenza di triptofano e cistina. Trattasi di quantità piccole ma, se si considera che i detti composti costituiscono l'unica fonte di azoto direttamente assimilabile del latte, è agevole comprendere come ad essi possa competere una non trascurabile importanza nello sviluppo dei fermenti lattici e specialmente di quelli scarsamente dotati di proprietà proteolitiche. Si può osservare infatti che il suindicato contenuto percentuale di aminoacidi è dello stesso ordine di grandezza delle quantità di peptone che, addizionato al latte nelle prove precedentemente esposte, ha influito in modo ben palese anche nella esigua proporzione del 0,005% (0,0008% di azoto). Le ricerche di Viale dimostrarono che gli aminoacidi presenti nel latte normale appena munto non derivano dall'azione di enzimi, di natura tripsica od ereptasica, prodotti dalla ghiandola mammaria o d'origine batterica; perciò lo stesso Autore suppone che essi siano direttamente secreti dalla ghiandola e Bottazzi (5) ritiene che essi rappresentino l'eccesso non utilizzato nella sintesi delle proteine che la mammella compie con gli aminoacidi attinti dal sangue. È quindi probabile che

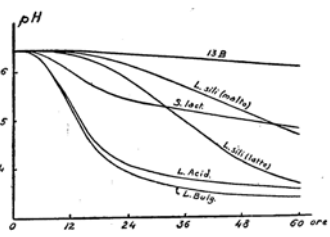
il contenuto del latte in composti azotati non proteici soggiaccia, per effetto di tutto un complesso di condizioni, fra cui particolarmente importante il tipo di alimentazione degli animali, a variazioni qualitative e quantitative che, pur non conferendo al latte una composizione anormale, — trattandosi in ogni caso di contenuti relativamente esigui — possono influire in modo accentuato sulle proprietà fermentative del latte stesso. Infatti è noto, specialmente in virtù delle osservazioni di Gorini (6), che il latte presenta delle caratteristiche di costituzione per cui, indipendentemente dalla composizione chimica rilevabile con i consueti metodi di analisi, lo sviluppo dei vari fermenti lattici risulta alquanto diverso da campione a campione. Le ricerche di Gorini hanno inoltre posto in evidenza che certi latti, che egli chiamò *disgenesici*, presentano una spiccata inettitudine colturale per alcuni fermenti lattici, i quali vi crescono molto stentatamente pur essendo capaci di buon sviluppo nel latte normale. Lo stesso Autore potè dimostrare che codesta *disgenesia* è dovuta alla carenza di un quid che può essere apportato o compensato con l'aggiunta di sostanze diverse, quali il peptone di caseina e l'estratto di lievito, sotto forma di vitamine o di un miglioramento della nutrizione azotata. Tutto ciò fa supporre che il latte presenti effettivamente una spiccata variabilità nei confronti di alcuni costituenti che, accessori per la loro esigua proporzione, sono di fondamentale importanza per il loro effetto sullo sviluppo di dati fermenti lattici, costituenti identificabili con alcuni composti azotati non proteici o con fattori di accrescimento.

Secondo le osservazioni di Gorini il suddetto carattere disgenesico sarebbe proprio di alcuni latti che si rivelano lenti a subire l'acidimento spontaneo e perciò impropri a date lavorazioni casearie.

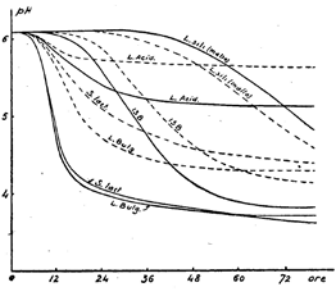
Tuttavia per un efficace studio dell'argomento, compresi i suoi aspetti tecnologici, conviene che il latte venga considerato distintamente come substrato colturale di singoli fermenti lattici e come substrato delle complesse fermentazioni che costituiscono l'acidimento spontaneo. Quanto è stato esposto in precedenza consente ora di affermare che il latte costituisce un terreno colturale diversamente favorevole allo sviluppo dei vari fermenti lattici, in quanto a condizionare lo sviluppo degli stessi intervengono principalmente le seguenti attitudini fisiologiche, diverse da specie a specie ed anche da ceppo a ceppo:

- Potere fermentativo per il lattosio;
- Utilizzazione dei composti proteici del latte (potere proteolitico);
- Esigenze di fattori di accrescimento.

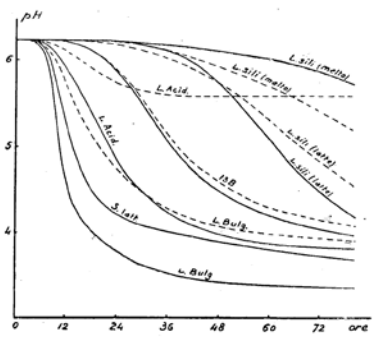
Donde si deduce che il latte è per sua natura un substrato più o meno *disgenesico* per tutti quei fermenti lattici che mancano di potere fermentativo per il lattosio, che sono incapaci, del tutto o quasi, di idrolizzare le proteine del latte o che, eventualmente, esigano speciali fattori di accrescimento non contenuti nel latte stesso. È evidente invece che i fermenti lattici capaci di fermentare il lattosio e dotati di potere proteolitico sufficientemente intenso il latte può non costituire un substrato favorevole solo nel caso che in esso facciano difetto i necessari fattori di accrescimento; non sembra che altri eventuali caratteri costitutivi del latte possano intervenire come cause limitanti lo sviluppo di codesti fermenti.



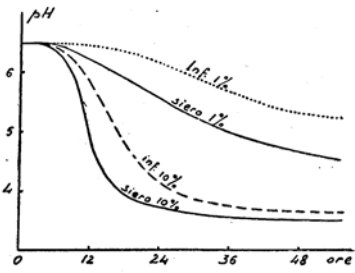
Diagr. I. Acidificazione in latte.



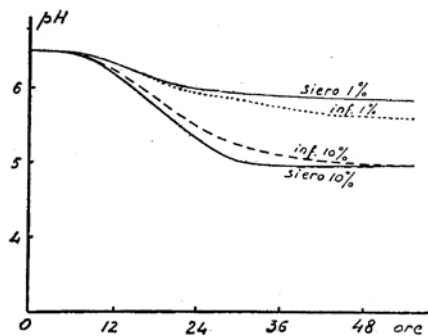
Diagr. II. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di siero di latte, in ragione del 10% e dell'1%.



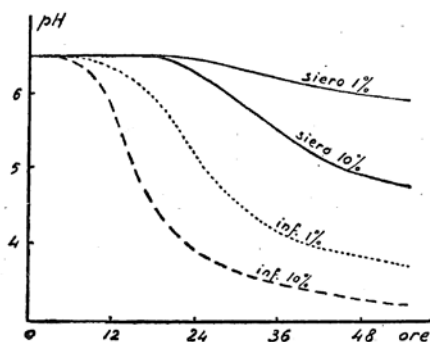
Diagr. III. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di latte, in ragione del 10% e dell'1%.



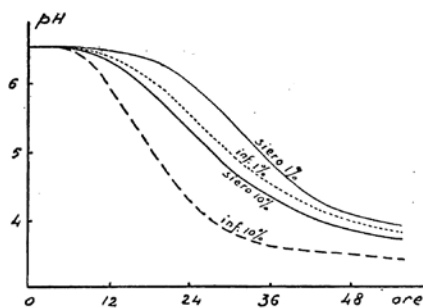
Diagr. IV. Lact. bulgaricus. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di siero di latte e di infuso vegetale.



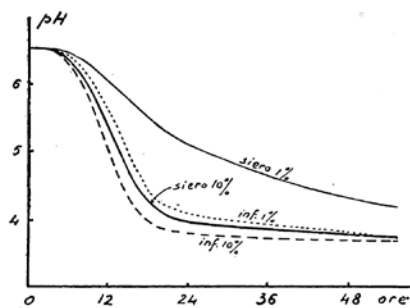
Diagr. V. *Lact. Acidophilus*. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di siero di latte e infuso vegetale.



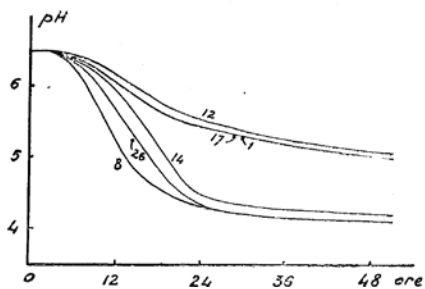
Diagr. VI. *Lact. sili*. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di siero di latte e infuso vegetale.



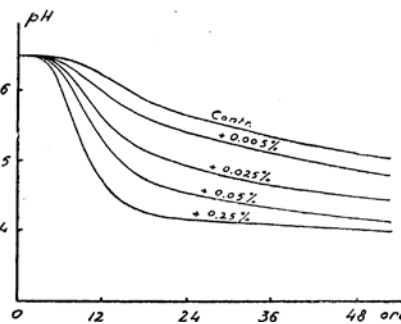
Diagr. VII. Ceppo 13 B. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di siero di latte e infuso vegetale.



Diagr. VIII. *Strept. Lacticus*. Acidificazione in terreno alla caseina idrolizzata, con addizione di siero di latte e infuso vegetale.



Diagr. IX. Acidificazione del latte prodotta da alcuni ceppi di *Strept. Lacticus*



Diagr. X. *Strept. Lacticus*, ceppo 1. Acidificazione del latte addizionato di quantità crescenti di peptone Witte.

Considerando il latte nei riguardi della sua fermentazione acida spontanea è evidente che il comportamento del latte medesimo risulta variabile sia in funzione della composizione qualitativa e quantitativa della microflora presente, sia anche in conseguenza delle variazioni più o meno pronunziate che si possono verificare nei suoi costituenti accessori. È però necessario tener presente che, accanto alla rapidità della acidificazione spontanea, in tema di attitudini fermentative del latte ha grande importanza l'influenza che i costituenti accessori possono esplicare principalmente attraverso un vario prevalere di microrganismi dotati di differenti proprietà fisiologiche.

#### RIASSUNTO

Dalle ricerche compiute risulta che a condizionare e limitare lo sviluppo in latte di alcuni fermenti lattici intervengono principalmente le seguenti attitudini fisiologiche, diverse da specie a specie ed anche da ceppo a ceppo: potere fermentativo per il lattosio, capacità di utilizzazione dei composti proteici del latte, esigenze di fattori di accrescimento o stimolanti. La ridotta capacità di utilizzare le proteine del latte, dovuta ad assai scarso potere proteolitico, rallenta e limita lo sviluppo e l'acidificazione di alcuni streptococchi ed è altresì la causa principale per cui alcuni fermenti lattici, lattosio fermentanti, crescono molto male e acidificano con grande lentezza. Particolarmente sensibile a stimolanti presenti nei vegetali e non contenuto nel latte, è il *Lact. Sili*.

Dalle ricerche compiute emerge infine l'importanza dei costituenti accessori del latte (composti azotati non proteici, fattori di accrescimento e stimolanti) sia nei confronti della rapidità di sviluppo dei singoli fermenti lattici in coltura pura, sia anche nei riguardi dei processi di fermentazione spontanea del latte stesso.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Aus den angestellten Untersuchungen ergibt sich, dass die Entwicklung einiger Milchfermente in Milch, hauptsächlich durch folgende, nicht nur von Art zu Art, sondern auch von Stamm zu Stamm verschiedene physiologische Eigenschaften bedingt und beschränkt wird: Gärungsvermögen gegenüber Milchzucker, Möglichkeit der Verwertung von Proteinkomplexen der Milch, Bedarf an Entwicklungs- oder Reizfaktoren. Die beschränkte Fähigkeit Proteine der Milch zu verwerten, die dem Mangel an proteolytischem Vermögen zuzuschreiben ist, verlangsamt und reduziert ausserdem die Entwicklung und die Ansäuerung einiger Streptokokken und ist ebenfalls die hauptsächlichste Ursache weshalb sich einige Milchzuckervergärende Milchfermente sehr schlecht entwickeln und sehr langsam ansäuern. Besonders empfindlich gegenüber Reizsubstanzen der Vegetalien ist der *Lact. Sili*, der in der Milch nicht enthalten ist.

Aus den angestellten Untersuchungen ergibt sich die Bedeutung der Nebenbestandteile der Milch (stickstoffhaltige, nicht proteine Komplexe, Entwicklungs- und Reizfaktoren) sowohl für die rasche Entwicklung der einzelnen Milchfermente in Reinkultur, als für spontane Gärungsprozesse der Milch selbst.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) *I. Politi* - Ricerche sui fermenti lattici. - Nota I (Questi Annali, 1940, I, pag. 65).
- (2) *S. Orla Jensen, N. C. Otte, Agnete Snog-Kjaer* - Die Stickstoffnahrung der Milchsäurebakterien. (Zentral. für Bakt II Abt., 1936, 94, pag. 460).
- (3) *S. Orla Jensen, N. C. Otte, Agnete Snog-Kjaer* - Der Vitaminbedarf verschiedener Bakterien ausserhalb der Gruppe der Milchsäurebakterien der Milch. (Zentr. für Bakt. II Abt., 1936, 94, pag. 447).
  - *S. Orla Jensen* - Les microorganismes et les vitamines. (Ann. des frement., 1937, 3, pag. 1).
  - *E. E. Snell, F. M. Strong, W. H. Peterson* - Pantothenic acid and nicotinic acid as growth factors for lactic acid bacteria (J. Amer. Chem. Soc. 1938, 60, pag. 2825. Jour. Bact. 1939, 38, pag. 293).
  - *E. E. Snell, W. H. Peterson* - Additional factors required by certain lactic acid bacteria. Jour. Bact. 1940, 39, pag. 273. Properties of a new growth factor for lactic acid bacteria. (J. Biol. Chem., 1939, 128).
  - *E. F. Moller* - Vitamin B<sub>6</sub> (Adermin) als Wuchstoff für Milchsäurebakterien. (Zeitschr. f. Phys. Chem., 1938, 254, pag. 285). Das Wuchsstoffsystem der Milchsäurebakterien. (Zeit. physiol. Chem., 1939, 260, pag. 246).
- (4) *G. Viale* - Biochim. e terap. sper., 1921, fasc. 11.
- (5) *F. Bottazzi* - Citato da P. Rondoni - Elementi di Biochimica, Torino, 1935.
- (6) *C. Carini* - Ricerche sul latte disgenesico. Rend. R. Acc. Lincei, nov. 1927, 6, pag. 338. Foraggi anticaseari e latte disgenesico. (La ricerca scientifica - Anno VII, Vol. I).



# Sulla presenza di Protozoi nelle colture di microbi cellulosolitici

Prof. Onorato Verona

(Ricevuto il 2 Maggio 1941-XIX)

Nel corso di ricerche eseguite sui germi cellulosolitici di Winogradsky, fin dal 1934, avevo segnalato come nelle colture di isolamento di questi microrganismi fosse dato di rinvenire più o meno abbondanti forme protozoiche (1).

L'osservazione, più volte ripetuta nelle piastre insemenate con terreni di diversissima origine e provenienza, ha richiamato la mia attenzione per l'analogia con quanto si verifica nelle colture liquide (l. di Beijerinck, di Ashby, ecc.) e nelle piastre di silice alla mannite allestite per l'isolamento degli Azotobatteri. Anche in queste si rinvengono, con singolare frequenza, specie di Protozoi tanto da ottenersi, dopo qualche passaggio in agar lavato, colture miste di Azotobatteri e Amebe (2). In merito a questa associazione alcune ricerche tendono a stabilire che la presenza di Protozoi stimola l'energia di sviluppo degli Azotobatteri (3).

Pertanto, data l'analogia dei reperti microscopici, ho voluto ricercare se, anche per i cellulosolitici, non si determinassero analoghe azioni di stimolo. La ricerca è stata orientativa e preliminare. Intanto ho potuto osservare che, tra i Protozoi che accompagnano le vegetazioni cellulosolitiche, si rinvengono, oltre a varie specie di Amebe, anche forme di Ciliati se pure in minor numero. Altresì è stato facile di constatare come, a seguito di alcuni passaggi su carta sterile disposta in geli di silice, si possano ottenere, come per gli Azotobatteri, colture pure miste di cellulosolitici e Amebe. Ciò è stato ottenuto per una *Cytophaga* sp. e per *Cellvibrio ochracea*.

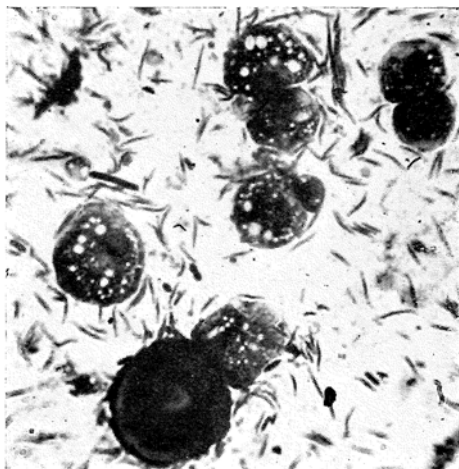
Ottenute tali colture miste le ho di nuovo passate su strisce di carta sterile disposte sui geli per osservare il progresso dell'attività cellulositica in confronto a quella manifestata su altre strisce da colture pure di *Cytophaga* e di *Cellvibrio*.

Non ho osservato differenze sensibili nella intensità e velocità di attacco della cellulosa.

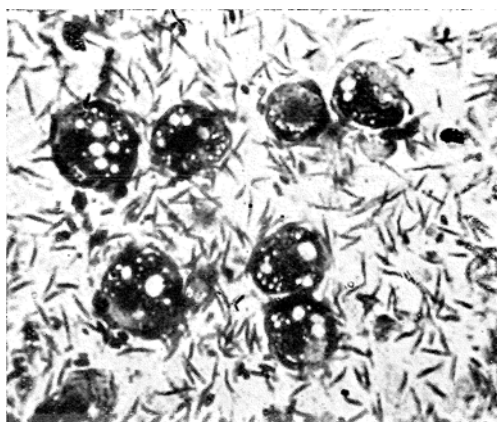
La ricerca, eseguita appena due o tre volte, ha, come ho premesso, carattere orientativo. Tuttavia non mi sembra che l'unione dei Protozoi ai cellulosolitici possa influire sensibilmente sul processo degradativo della cellulosa già così rapido ed intenso per opera dei cellulosolitici stessi. Bisognerebbe nel caso ammettere una concomitante azione cellulosolitica dei Protozoi, azione che ancora non sembra dimostrata.

Che poi i Protozoi esercitino una azione di stimolo sulla moltiplicazione dei cellulosolitici, come si vuole ammettere per gli Azotobatteri, potrebbe

anche essere quale risultato di una generale azione di concorrenza vitale atteso il noto potere batteriofagico dei Protozoi. Ulteriori osservazioni potranno precisare meglio il valore da attribuirsi alla associazione segnalata.



*Amebe* socie a *Cytophaga* sp.  
(da piastre insemizzate con terreno di bosco)  
preparati colorati con eritrosina fenica e violetto di genziana x 2100 circa



## RIASSUNTO

Viene messa in rilievo la frequente associazione di Protozoi e microbi cellulosolitici nelle colture di isolamento di questi. Non sembra che la presenza dei Protozoi influisca sulla velocità ed intensità di attacco della cellulosa da parte dei celluloolitici stessi.

## ZUSAMMENFASSUNG

Verf. hebt hervor dass in den Isolierungskulturen von zellulosolytischen Mikroben häufig Protozoën assoziiert sind. Es scheint dass die Anwesenheit von Protozoën keine Einfluss auf die Geschwindigkeit und Intensität des Angriffes der Zellulose durch die zellulosolytischen Mikroben ausübt.

## BIBLIOGRAFIA

(1) *O. Verona* - Colture spontanee di cellulolitici aerobi: *Cytophaga Winogradskii* n. sp. - (Rend. R. Acc. Naz. Lincei, Cl. Sci., XIX, 731, 1934).

(2) *T. F. Winogradow* - Amöbenzucht auf dem *Azotobacter chroococcum*. (Cent. f. Bakt., II, LXXII, 374, 1927).

(3) *Cutler e Ball* - Influence of protozoa on the process of nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum*. (Ann. Appl. Biol., XIII, 1926).

(3) *Nasir S. M.* - Some preliminary investigations on the relations hip of protozoa to soil fertility with special reference to nitrogen fixation. (Ann. Appl. Biol., X, 1923):

(3) *Winogradow T. F.* - Beiträge zur Frage der Wirkung der Bodena-möben auf das Wachstum und die Entwicklung des *Azotobacter chroococcum* unter Versuchsbedingungen auf sterilem Boden. (Centr. f. Bkt., II, LXXIV, 14, 1928).

(3) *Hirai K. e Hino I.* - Influence of soil protozoa on nitrogen fixation by *Azotobacter*. Proc. First (Int. Congr. of Soil Sci., Washington, 1927).

## **Sulla fermentazione alcoolica del succo di sorgo zuccherino**

**Prof. Ezio Emiliani**

*(Ricevuto il 15 Maggio 1941-XIX)*

Il sorgo zuccherino è stato selezionato e diffuso in Italia dal prof. E. Parisi (1) principalmente allo scopo di produrre alcool carburante.

Fin dagli inizi di questa nuova attività agricola ed industriale italiana, furono diffuse le più strane e ridicole dicerie tutt'altro che serene e disinteressate. Fra l'altro si avanzavano dubbi circa la fermentiscibilità del succo di questa nuova saccarifera.

Queste voci «tendenziose» circolano tutt'ora e pertanto le incertezze in materia non sono poche. Ci si chiede, per esempio, se il succo di sorgo si presta ad una rapida fermentazione industriale; se il succo di questa graminacea fermenta bene come quello di bietola; se è necessario aggiungere melassa di bietola o sali nutritivi per avere una rapida e completa fermentazione; ecc.

Con questo lavoro intendiamo rispondere a tali domande, sia confrontando alcuni costituenti del sugo di sorgo con quello di bietola, sia con prove di fermentazione.

\*\*\*

Come è noto per la crescita, per la moltiplicazione e per l'energia fermentativa del lievito sono di particolare importanza, oltre allo zucchero, anche i composti azotati ed alcuni sali inorganici (sali nutritivi).

Già Pasteur (2) osservò che la sola aggiunta di sali ammoniacali, come fonte d'azoto, alle soluzioni nutritive, era meno favorevole dei composti azotati organici; queste osservazioni furono confermate dal A. Mayer (3) e da Nægeli (4). Wildier (5) anzi constatò che seminando poche cellule di lievito in una soluzione nutritiva contenente l'azoto esclusivamente sotto forma di sali ammoniacali, non si aveva nè moltiplicazione delle cellule nè fermentazione dello zucchero, ma si notava una attività normale solo dopo l'aggiunta di piccole quantità di estratto di lievito o peptone.. Da queste esperienze Wildiers concluse che per la moltiplicazione del lievito l'azoto inorganico non è sufficiente, ma che sarebbe necessaria la presenza di una sostanza organica, di natura sconosciuta alla quale egli diede il nome di «bios».

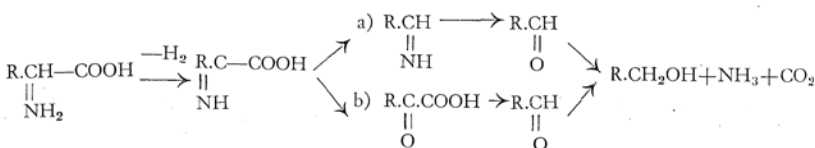
Se invece si seminano grandi quantità di lievito nelle soluzioni nutritive contenenti esclusivamente sali minerali e zucchero si ha, come ha dimostrato Kossovicz (6), uno sviluppo ed una attività fermentativa normale.

La interpretazione che Wildier diede alle proprie esperienze oggi non è generalmente accettata ma si ammette, più semplicemente, che il fer-

mento può utilizzare i sali ammoniacali soltanto dopo un conveniente periodo di assuefazione. Infatti seminando poche cellule di lievito ed aggiungendo alla soluzione nutritiva, oltre ai sali ammoniacali, piccole quantità di estratto di malto, peptone, ecc., si favorisce in un primo tempo lo sviluppo del lievito il quale può così abituarsi ai sali d'ammonio. Anche nel caso di grandi semine, si portano nel liquido sostanze azotate organiche, derivanti dall'autolisi delle cellule morte.

D'altra parte Duclaux (7) ed altri ricercatori dimostrarono che in presenza di sufficienti quantità di composti azotati organici, i sali ammoniacali non solo vengono ottimamente utilizzati dal fermento, ma sono assimilati in preferenza all'azoto organico.

Circa l'utilizzazione dell'azoto organico è da ricordare anzitutto l'importante risultato conseguito da Erlich (8) nelle sue esperienze. Questo A. ha infatti dimostrato che il fermento alcoolico può attaccare gli amminoacidi formando  $NH_3$ ,  $CO_2$  ed alcoli superiori secondo lo schema (9):



cioè si avrebbe anzitutto una deidrogenazione dell'amminoacido ad imminoacido, quest'ultimo si scinde poi o secondo lo schema a) in aldimide e quindi in aldeide, o secondo lo schema b) in chetoacido e quindi in aldeide. L'aldeide viene in fine ridotta ad alcool.

Così dalla leucina si forma l'alcool amilico, dalla valina l'alcool isobutilico, ecc. L'ammoniaca viene utilizzata dal lievito, mentre nel liquido rimangono come scorie gli alcoli superiori i quali nella distillazione costituiscono il così detto olio di fusel od alcoli di coda.

Oltre agli amminoacidi i lieviti utilizzano le ammidi, anzi è stato dimostrato che l'azoto ammidico è utilizzato con maggior facilità dell'azoto amminico (10). Anche le ammine alifatiche e le ammine aromatiche contenenti il gruppo amminico nella catena laterale non sarebbero prive di valore come alimento azotato. Come pure le ammine puramente aromatiche, le basi pirimidiche e puriniche, l'arginina, la lisina e l'istidina sarebbero sfruttate dal lievito come fonti d'azoto (11).

Sulla base di quanto abbiamo succintamente esposto si può concludere che l'alimento azotato esercita una influenza decisiva sull'accrescimento e sulla energia fermentativa del lievito e che oltre alla quantità ha notevole importanza anche la qualità. Cioè il lievito utilizza i composti azotati a basso peso molecolare (che possono diffondere cioè attraverso la parete cellulare) tanto meglio quanto più facilmente cedono il loro azoto sotto forma di ammoniaca.

Ora, se con opportuni metodi analitici, determiniamo, qualitativamente e quantitativamente, le varie sostanze azotate del succo zuccherino in esame, avremo un importante elemento di giudizio circa la sua fermente-

scibilità specialmente se confrontiamo questi dati con quelli di un succo il cui comportamento è già noto nella pratica dell'industria fermentativa.

A questo scopo abbiamo determinato nel succo di sorgo i vari gruppi di sostanze azotate nel seguente modo:

*Azoto totale* secondo Kjeldhal

*azoto proteico* con il metodo di Barnstein-Kjeldhal

*azoto amminico* con il metodo di Steinegger (12)

*azoto ammoniacale* distillando a pressione ridotta in presenza di ossido di magnesio

*azoto ammidico* come l'azoto ammoniacale previa idrolisi con acido cloridrico diluito.

Nella tabella I, in cui ogni dato rappresenta la media di almeno tre analisi, sono esposti, oltre ai dati ottenuti col succo di sorgo, anche quelli riguardanti il sugo di bietola, per gli opportuni confronti con questa pianta già da lungo tempo sfruttata industrialmente.

TABELLA I

	sugo di prima <i>pressione</i> di	
	bietola	sorgo zuccherino
	% cc. sugo	
Azoto totale	0,245	0,108
» proteico	0,120	0,050
» amminico	0,043	0,025
» ammidico	0,027	0,014
» ammoniacale	0,016	0,006
Altre forme azotate	0,039	0,013

I vari gruppi di sostanze azotate sono quindi nel sugo di bietola più abbondanti che nel sugo di sorgo. Però dal punto di vista pratico non è esatto confrontare il sugo di *pressione* di bietola con quello di sorgo, in quanto la bietola viene industrialmente esaurita solo per diffusione ed in tale processo viene estratto poco più del 50% dell'azoto totale.

Oltre a ciò durante l'esaurimento di questa piante, i sughi subiscono delle diluizioni più o meno forti tanto che sarebbe difficile un confronto diretto dei sughi essendo l'entità di tali diluizioni notevolmente diversa a seconda delle fabbriche, delle necessità di lavorazione, ecc.

Per ciò abbiamo ritenuto più razionale riferire i valori ottenuti a 100 gr. di zucchero espresso come invertito.

Dalla tabella appare che, mentre l'azoto totale del sugo di sorgo è inferiore a quello della bietola integra, esso è invece superiore a quello del sugo di diffusione e ciò è dovuto principalmente al fatto che circa l'80%

delle sostanze proteiche non diffondono. Tuttavia le sostanze proteiche costituiscono per il lievito un alimento di ben scarso valore, almeno nelle fermentazioni rapide a tipo industriale, per ciò la nostra attenzione si deve

Azoto riferito a 100 gr. di zucchero espresso come invertito

TABELLA II

	bietola integra	sugo di diffusione di bietola	sugo di pressione di sorgo
Azoto totale	1,03	0,56	0,75
» proteico	0,56	0,12	0,33
» amminico	0,18	0,17	0,17
» ammidico	0,10	0,09	0,09
» ammoniacale	0,05	0,05	0,04
Altre forme azotate	0,14	0,13	0,12

restringere all'azoto non proteico e particolarmente all'azoto ammidico ed ammoniacale che il lievito assimila con grande facilità.

Sotto questo punto di vista si conclude che, nella pratica, i sughi di sorgo e di bietola si equivalgono.

Un altro gruppo di composti che hanno una notevole importanza per l'attività del lievito sono i costituenti inorganici.

Esaminando le ceneri dei lieviti si ha subito un'idea della importanza dei vari elementi:

TABELLA III

Composizione delle ceneri del lievito secondo Lintner (13)

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	50,6
SiO <sub>2</sub>	1,3
K <sub>2</sub> O	33,4
MgO	6,1
CaO	5,5
SO <sub>3</sub>	0,6
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,5

Anche per i costituenti minerali si può ripetere ciò che è stato detto per i composti azotati e cioè che le ceneri del sugo di sorgo sono in quantità inferiore a quelle contenute nel sugo di *pressione* della bietola ma sono invece in quantità maggiore a quelle del sugo di *diffusione* della bietola come appare dalla tabella IV. Ciò è dovuto, oltre alla diluizione che ha subito il sugo, anche al fatto che oltre il 30% delle ceneri contenute nella bietola non passano nel sugo di diffusione.

Ma per avere un confronto più esatto nella tabella V le ceneri vengono riferite a 100 gr. di zucchero espresso come invertito.

In conclusione si può affermare che sia le sostanze azotate che i costituenti minerali del sugo di sorgo non sono praticamente inferiori a quelli della bietola e che pertanto, anche basandosi unicamente sull'analisi chi-

TABELLA.IV

	Sugo di prima pressione di		sugo di diffusione di bietola
	bietola	sorgo	
Ceneri totali	0,75	0,60	0.40
	composizione delle ceneri		
K <sub>2</sub> O	37,5	36,8	54,5
Na <sub>2</sub> O	9,5	2,2	7,4
CaO	15,0	16,9	3,3
MgO	10,8	13,1	10,9
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	15,6	14,8	13,6
SO <sub>3</sub>	6,8	8,1	7,7
Cl	1,6	4,7	2,5

TABELLA V

Ceneri riferite a 100 gr. di zucchero espresso come invertito

	bietola integra	sugo di diffusione di bietola	sugo di presswne :li sorgo
Ceneri totali	4,54	2,90	3.80
K <sub>2</sub> O	1.51	1.16	1.25
Na <sub>2</sub> O	0,24	0,14	0.07
CaO	0,36	0,02	0.57
MgO -	0.30	0,20	0.44
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.48	0.31	0.33
SO <sub>3</sub>	0,18	0,14	0.34
Cl	0.02	0,04	0,09

mica dei sughi, si può prevedere che il sugo zuccherino di questa pianta debba fermentare industrialmente bene, come quello di bietola.

Abbiamo però voluto confermare questa nostra conclusione anche con prove di fermentazione, in condizioni il più possibile vicine a quelle che si verificano nella grande industria e cioè:



a) riproduzione continua del lievito in sugo di sorgo sterilizzato ed areato;

b) sviluppo del lievito (corrispondente ai così detti *intermedi* delle distillerie;

c) aggiunta degli intermedi al sugo da fermentare nel rapporto 1:3.

In ogni stadio di lavorazione si fecero delle prove con sugo non diluito e con sugo diluito con acqua (\*), come pure con aggiunte di sali ammoniacali (solfato o fosfato di ammonio).

In tutte queste prove si ebbe una velocità di fermentazione ottima. Solo usando sugo integro (cioè non diluito) la fermentazione fu un po' più lenta nell'ultimo stadio a causa della alta concentrazione dell'alcool (9-11%). Ma anche in questo caso dopo 24 ore tutto lo zucchero era fermentato.

Aggiungendo fosfato o solfato di ammonio (2-0,5%) non abbiamo riscontrato sensibili vantaggi, tuttavia è opportuno, come per il sugo di bietola, aggiungere circa l'1% di tali sali ai mosti a lievito.

*Milano*, maggio 1941-XIX.

*Centro Naz. di Studi sul Sorgo Zuccherino annesso al R. Istituto di Industrie Agrarie della R. Università.*

#### RIASSUNTO

Vengono determinati i vari gruppi di sostanze azotate ed i costituenti delle ceneri del succo di sorgo zuccherino. Vengono pure eseguite con questa materia prima delle prove di fermentazione.

In base ai risultati ottenuti si conclude che, anche industrialmente, il succo di sorgo fermenta bene come quello di bietola.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die verschiedenen Gruppen von stickstoffhaltigen Substanzen und die Bestandteile der Asche des Saftes des *Sorghum saccharatum* bestimmt. Mit diesem neuen Rohstoff sind auch Gärungsproben unternommen worden.

An der Hand der erhaltenen Resultate kommt Verfasser zur Schlussfolgerung dass, auch für industrielle Zwecke, der Sorghumsaft eben so gut gärt wie der Betasaft:

#### BIBLIOGRAFIA

(1) *E. Parisi* - Una pianta industriale trascurata: il sorgo zuccherino. (Italia Agricola, 1935, 72, n. 8).

(2) *M. Pasteur* - Nouveaux faits concernant l'histoire de la fermentation alcoolique. (C. r. 1858, 47, 1011).

---

(\*) Nell'industria il sugo viene sempre diluito dall'acqua necessaria per il massimo esaurimento delle canne.

(3) *D. A. Mayer* - Untersuchungen über die alkoholische Gärung und die Ernährung des Bierhefepilzes. (Pogg. Ann., 1871, 142, 293).

(4) *Nägeli* - Sitzungsber. Bayer Akad. Wiss. 1879, 9, 313 (cfr. Euler e Lindner. «Chemie der Hefe». Akad. Verlagsgesellschaft in Leipzig, 1915, pag. 229).

(5) *E. Wildiers* - Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. (La Cellule, 1901, 18, 313).

(6) *A. Kossowicz* - Zetschr. Landwirtsch. Versuchesen in Oesterreich, 1906, 18, 688 (cfr. Euler e Lindner. o. c., pag. 229).

(7) *M. Duclaux* - Observations en réponse à la note de M. Millon relative aux fermentations alcooliques. (C. r. 1864, 58, 450).

(8) *F. Erlich* - Ueber die Entstehung des Fuselöl. (Zetschr. d. Vereins d. deutsch. Zuckerind., 1905, 55, 539).

(9) cfr. *P. Karrer* - Lehrbuch d. organ. Chemie. Thieme. Leipzig, 1937.

(10) *E. Parisi* - Sulla fermentazione alcoolica degli amminoacidi. (Ann. Chim. Appl., 1929, 19, 234).

*G. Barbera* - Sulle sostanze estrattive dei vini. (Nota II - Ann. Chim. Appl., 1933, 23, 115).

(11) *Bokorny* - Ueber die Kohlenstoffernährung der Sprosshefe. (Dinglers polyt. Journal., 1997, 303, 115, 140 e 163).

(12) *E. Parisi* - Influenza della glutammina delle bietole sul dosamento e sulla estrazione del saccarosio. (La chimica e l'industria, 1939, 21, 129).

(13) *Lintner* - Z. f. d. ges. Brauw., 1883, 6, 397 (cfr. Euler e Lindner o. c., pag: 73).

# Due nuove specie di cellulolitici aerobi

Prof. Onorato Verona

(Ricevuto il 16 Maggio 1941-XIX)

Dopo gli studi di Winogradsky (1) che datano, ormai, da tredici anni, l'elenco delle specie cellulolitiche aerobiche (ed invero, dopo i primi studi di Omelianski, anche di quelle anaerobiche) si è andato sensibilmente arricchendo.

A tacere delle specie descritte da Simala (2), Horowitz-Wlassowa (3) ed Otani (4) e che, per i loro caratteri, non rientrano nel gruppo dei germi di Winogradsky, sono da ricordarsi, in ordine cronologico, le segnalazioni di Rippel e Flehmig (5), Verona (6), Stapp e Bortles (7), G. D. Castelli (8) e T. Castelli (9) e per le quali vennero descritte nuove specie di *Cytophaga* e di *Cellvibrio*.

Nell'ambito di quest'ultimo genere — entro il quale rientrano le specie qui descritte — Winogradsky segnalò *Cellv. ocracea* e *flavescens*; Stapp e Bortels, *Cellv. fulva* e *vulgaris*; G. D. Castelli, *Cellv. aurantiacus*; e T. Castelli, infine, *Cellv. violacea*. Il genere è andato quindi arricchendosi di specie tanto da avvicinarsi, per numero, al ricco genere *Cytophaga*. Del resto, lo stesso Winogradsky, scriveva al riguardo che le specie di *Cellvibrio* sembrano essere piuttosto numerose.

Le specie note del genere si distaccano assai bene fra loro — per quanto sommariamente descritte — sia per i caratteri che accompagnano le loro vegetazioni su carta, sia per i caratteri morfologici sia, infine, per alcuni caratteri nutrizionali.

\*\*\*

Le nuove specie rinvenute sono state isolate da terreni di bosco, provenienti dalla Foresta di Vallombrosa (Firenze), con il noto metodo delle piastre al silico-gele. Trattavasi di terreni acidi, umosi, privi di calce, relativamente umidi al momento del prelievo.

Atteso i loro caratteri più espressivi tali specie sono state denominate *Cellvibrio rosea* n. sp. e *Cellv. minuscula* n. sp.

Di esse, facilmente isolate in coltura pura, è stato seguito lo sviluppo su carta da filtro (comune carta bibula) disposta su geli di silice, conforme il noto metodo di coltura, con il rilievo dei caratteri microscopici, ed è stato tentato lo sviluppo nei substrati ausiliari suggeriti da Winogradsky.

Precisamente:

- 1) Substrato T: peptone gr. 4, glucosio gr. 2, cloruro sodico gr. 0,5, agar gr. 2, acqua dist. cc. 100.
- 2) Substrato costituito da: solfato ammonico gr. 1,5, fosfato bipotassico gr. 1, agar gr. 2, acqua dist. cc. 100.
- 3) Substrato come in 2) con aggiunta dall'1% di amido.

- 4) Substrato come in 2) con aggiunta dell'1% di gomma arabica.
- 5) Substrato come in 2) con aggiunta dell'1% di glucosio.
- 6) Agar-fagioli saccarosato al 2%.

#### CELLVIBRIO ROSEA n. sp.

Su carta da filtro *Cellv. Rosea* dà luogo ad una vegetazione color rosa pallido che si fa appena un po' più scura trascorso qualche tempo. Nei trapianti di isolamento come di coltura essa tarda a comparire ma poi si estende piuttosto rapidamente. Nelle vecchie colture si formano ammassi mucosi semi-fluidi di color roseo, lucenti e trasparenti. In corrispondenza la carta si disorganizza come è indice, a parte l'esame microscopico che dimostra l'invasione del microbio entro le fibre, la comparsa di punteggiature trasparenti, più o meno grandi e confluenti.

Il microbio si presenta sotto la forma di bastoncini dritti o tipicamente curvi, ad estremità arrotondate, di  $\mu$  0,8x1.7-5.3, mobili per un ciglio. Spesse volte essi si trovano riuniti in più elementi (fig. 2 della Tav.) sì da simulare un aspetto filamentoso e dare quadri paragonabili a quelli riportati da Winogradsky per una specie di *Cellfalcicula* formante tacche di color verdegiada (confr. Winogr., Tav. VIII, 8).

Si colora bene con i comuni colori di anilina. Prende anche bene, a fresco, il violetto di genziana. Con tale colorazione, anzi, si rende evidente lo strato mucoso che riveste gli elementi cellulari. A fresco, le dimensioni appaiono molto maggiori che non nei preparati fissati: lo spessore sale a  $\mu$  1.7 e la lunghezza a  $\mu$  3.5-10.6.

Alla colorazione di Gram il microbio non assume un comportamento deciso; tende a rimanere, tuttavia, Gram-positivo.

Nei substrati ausiliari lo sviluppo è stentato ma positivo. Sviluppa bene a temperatura ambiente (16-18° C.) ma molto meglio a 24-25° C.: sviluppo si ha ancora a 33°; non più però a 37-38° C.

Circa la sua posizione sistematica essa appare ben definita attraverso l'esame dei caratteri morfologici.

Breve diagnosi:

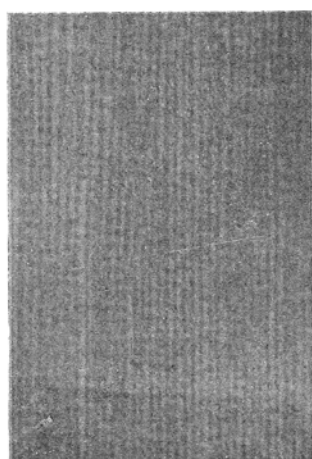
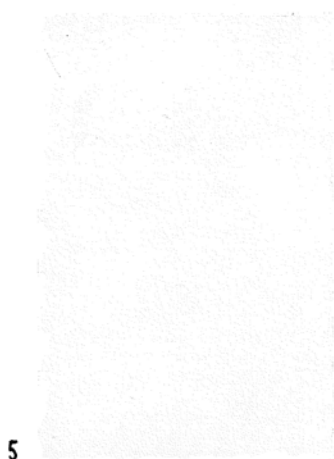
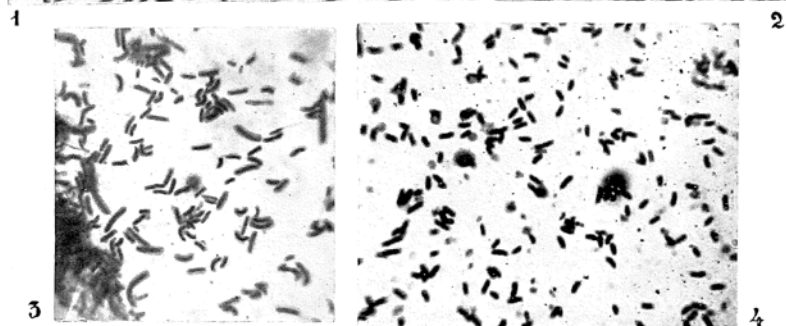
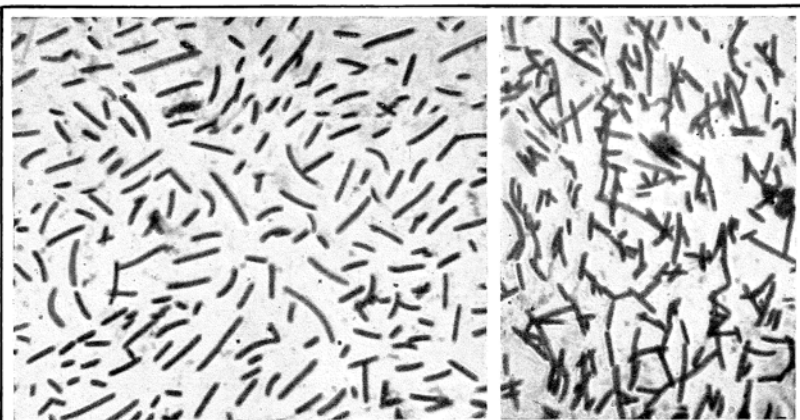
*Cellvibrio rosea* n. sp.

Bastoncini isolati, talvolta riuniti in fili, più o meno curvi o dritti ad estremità arrotondate. Nei preparati fissati misurano  $\mu$  1.7-5.3x0.8; nei preparati a fresco  $\mu$  3.5-10.6x1.7. In questi è evidente lo strato mucosa che li avvolge. Sono mobili per un ciglio, non sporigeni, aerobi, tendenzialmente Gram-positivi. Ottimo di temperatura per lo sviluppo 20-25° C. Nei comuni terreni culturali sviluppa assai scarsamente. In carta disposta in piastre di silice gelatinosa forma vegetazioni di color rosa abbondantemente mucose. Fibrolisi lenta.

*Habitat*: in terra di bosco a Vallombrosa presso Firenze.

#### CELLVIBRIO MINUSCULA n. sp.

Su carta da filtro questa specie forma tacche secche, non mucose, di color ocre piuttosto scuro specie verso la periferia. Le stesse tacche sono





circondate da un alone giallognolo, indice della solubilità del pigmento.

Lo sviluppo non è molto rapido. Effettuata la semina con piccoli frammenti di coltura al centro di un disco di carta, occorrono per lo meno 7-10 giorni perchè si formi una tacca di 5-6 cm. di diametro.

Il microbio si presenta sotto forma di corto bastoncino ricurvo, ad estremità arrotondate, mobilissimo per un ciglio, di  $\mu$  1.4-1.8x0.6. Queste dimensioni ridotte contrastano singolarmente con quelle della specie precedente (confr. fig. 1 e 4 della Tav.).

Si colora bene con i comuni colori. A fresco, colorato con violetto di genziana, misura  $\mu$  2.4-2.7x0.8-0.9. È Gram-positivo.

Nei substrati ausiliari non sviluppa; nelle piastre al silico-gele con carta non sviluppa se presente solfato ammonico invece di nitrato potassico.

A temperatura ambiente (16-18° C.) lo sviluppo è piuttosto lento; migliore si ha a 24-25°; mancante a 33°.

Sulla carta esercita azione ossidante.

Atteso i caratteri morfologici la specie rientra tipicamente nel genere *Cellvibrio*. In quanto al riferimento specifico il colore delle vegetazioni l'avvicina a *Cellv. ochracea* di Winogradsky e a *Cellv. fulva* di Stapp e Bortels.

Invero alcune differenze di tonalità, si hanno nel colore delle vegetazioni di questa specie; in particolare, la specie di Stapp e Bortels, prima di divenire color ocra scuro fino a bruno-ruggine, assume una colorazione giallo-oro.

Malgrado ciò, tali differenze cromatiche non possono non essere che indiziarie in quanto soggettive ed in quanto poco ancora è noto sulle condizioni della cromogenesi di queste specie e di eventuali sue variazioni. Dalla specie di Winogradsky si differenzia, ad ogni modo, per le dimensioni molto più ridotte e per lo sviluppo meno evidente e molto più lento. Dalla specie di Stapp e Bortels si distacca anche per le dimensioni oltre che per il comportamento al Gram ed alcuni caratteri nutrizionali.

D'altra parte non stupisce che a questo gruppo di germi formanti vegetazioni ocracee appartengano più specie. Lo stesso Winogradsky, al riguardo, scriveva: «le nombre des souches proudisant sur le papier cette teinte jaune-ocre parait assez grand».

Breve diagnosi:

*Cellvibrio minuscula* n. sp.

Bastoncini isolati, curvi, ad estremità arrotondate, mobilissimi, di  $\mu$  1.4-1.8x0.6, asporulanti, aerobi, Gram-positivi. Ottimo di temperatura 24-25° C. Nei comuni terreni colturali non sviluppa. In carta azione quindi specifica, ossidante. Vegetazione su carta di color ocra piuttosto scuro circondate da un alone giallo.

*Habitat*: in terra di bosco a Vallombrosa, presso Firenze.

\*\*\*

Con la presente segnalazione le specie *Cellvibrio* note ammontano quindi ad otto. Esse sono abbastanza bene differenziabili, come già è stato detto, e come emerge dal seguente prospetto riassuntivo e dalla annessa chiave spe-ciologica.

QUADRO COMPARATIVO DEI PRINCIPALI CARATTERI  
DELLE SPECIE DEL GENERE CELLVIBRIO

	dimensioni $\mu$	Gram	mobilità	colore delle tacche su carta	sviluppo su agar			
					peptone	glucosio	amido	gomma
<i>C. ochracea</i> Win.	2-4	?	+	giallo-ocra	—	—	—	—
— <i>flavescens</i> Win.	2.5-5×0.5	?	+	crema, prima chiaro indi scuro	+	+	+	+
— <i>fulva</i> Stapp et Bortels	1.5-3×0.3-0.4	—	+	prima giallo-oro indi bruno-ruggine	+	?	+	?
— <i>vulgaris</i> Stapp et Bortels	id. fino a $\mu$ 4	—	+	incolore	+	?	+	?
— <i>aurantiacus</i> G. D. Castelli	2×0.4	?	+	arancio	—	—	—	—
— <i>violacea</i> T. Castelli	1.5-2×0.3-0.5	—	—	violaceo	—	—	—	—
— <i>rosea</i> n. sp.	1.7-5.3×0.8	+	+	rosa	+	+	+	+
— <i>minuscola</i> n. sp.	1.9-1.8×0.6	+	+	ocra più o meno scuro	—	—	—	—

CHIAVE INDICATIVA

- A - Assenza di pigmento (1) 1-C. *vulgaris* Stapp et Bortels  
 B - Produzione di pigmento:  
 1- Vegetazioni debolmente colorate in crema 2-C. *flavescens* Win.  
 2- Vegetazioni di color giallo-oro fino ad ocra scuro  
 a - veg. prima giallastre, indi bruno-ruggine 3-C. *fulva* Stapp et Bortels  
 b - veg. di color ocra più o meno scuro:  
 - bastoncini curvi lunghi  $\mu$  1.4-1.8 4-C. *minuscola* Ver.  
 » » »  $\mu$  2-4 5-C. *ochracea* Win.  
 3 - Vegetazioni di color arancio 6-C. *aurantiacus* G. D. Cast.  
 4 - » » » rosa 7-C. *rosea* Ver.  
 5 - » » » violaceo 8-C. *violacea* T. Cast.

RIASSUNTO

Nella presente Nota vengono descritte due nuove specie di *Cellvibrio* producenti su carta vegetazioni di color rosa ed ocra ed inquadrate con le specie già note. Esse sono state isolate da terreni di bosco.

(1) La produzione di pigmento si intende riferita su carta disposta su geli di silice



ed imbevuta della sol. di Winogradsky.

## ZUSAMMENFASSUNG

Verfasser beschreibt zwei neue *Cellvibrio* — Arten die auf Papier rosa — und ockerfarbige Vegetationen bilden und zählt dieselben zu den schon bekannten Arten. Die genannten Arten sind aus Proben von Walderde isoliert worden.

## BIBLIOGRAFIA

(1) *Winogradsky S.* - Études sur la microbiologie du sol - Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. (Ann. Inst. Pasteur, XLIII, 549, 1929).

(2) *Simala E.* - Ueber den Abbau der Cellulose durch Mikroorganismen. I. Zur Morphologie und Physiologie der aeroben sporenbildenden Cellulose bakterien. (Ann. Ac. Sc. Fennicae, A. XXXIV, 1, 1931).

— - Zur Chemie der Cellulosezeretzung durch die aeroben sporenbildenden Cellulosebakterien (ibidem, 1931).

(3) *Horowitz-Wlassowa L. M.* - Zur Frage der aeroben Zellulosezeretzung (Cent. f. Bakt., II, XCIII, 347, 1935).

(4) *Otani Y.* - A new bacterium (*Pseudomonas fibrolysis* n. sp.) decomposing cellulose (Bull. Agr. Chem. Soc. of Japani, VX, 1, 1939).

(5) *Rippel A. e Flehmig T.* - Untersuchungen über den aeroben Cellulosezeresetzer *Itersonia ferruginea* (Arch. f. Mikr., IV, 229, 1933).

(6) *Verona O.* - Colture spontanee di cellulositici aerobi: *Cytophaga Winogradiskii* n. sp. (Rend. R. Acc. Lincei, XIX, 731, 1934).

(7) *Stapp C. e Bortels H.* - Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstren (Centr. f. Bakt, II XC, 28, 1934).

(8) *Castelli G. D.* - Sul processo microbico di degradazione della cellulosa (Riv. di Biol., XVIII, 431, 1935).

(9) *Castelli T.* - Una nuova specie cellulositica aerobia (Boll. Ist. Sier. Milanese, XVIII, 1939).

## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

1-2 - *Cellvibrio rosea* n. sp. - Preparati fissati e colorati con eritrosina fenica e violetto di genziana. Ingr. circa 2500.

3 - id. - Da preparato a fresco colorato con violetto di genziana. Ingr 1650

4 - *Celvibrio minuscula* n. sp. - Preparato fissato e colorato con eritrosina fenica e violetto di genziana. Ingr. circa 2500.

5-6- Colore delle tacche, su carta, di *Cellv. rosea* e *Cellv. minuscula*.

## **Sulla macerazione biochimica della "Ampelodesma mauritanica, Dur. e Schinz, e sull'azione dei microbi alcali- tolleranti nella preparazione di paste cellulosiche.**

**Prof. S. Riccardo** (Direttore)

(Ricevuto il 26 Maggio 1941-XIX)

I risultati di un primo contributo (1) hanno messo in chiaro come alcuni microrganismi possano resistere e svilupparsi ottimamente in liquidi contenenti dosi relativamente alte di carbonato sodico, contribuendo, indipendentemente dall'azione dell'alcali, all'opera di disintegrazione delle sostanze incrostanti la cellulosa.

Le esperienze di cui sopra venivano eseguite su di un materiale che, per la sua durezza, aveva resistito fin qui all'attacco di microrganismi pectinolitici. Lo stato di disgregazione raggiunto dai truciolini di tralci viticoli è stato tale da incoraggiare, non solo la sperimentazione con questa essenza legnosa, ma a provare anche su altre piante, che, per la presenza di silice o per altre cause, non si erano prestate finora ad una buona macerazione microbiologica, o biochimica nel senso antico della parola (\*).

Fra queste ultime ve ne sono alcune, come l'ampelodesma (*Ampelodesma mauritanica* Dur e Schinz) e la ginestra di Spagna (*Spartium jun-ceum* L.), che hanno richiamato soprattutto la nostra attenzione.

L'ampelodesma è una pianta che viene denominata «lisca» in Liguria, «saracchi» in Toscana, «liama» o «ligàma» in Sicilia, per il suo uso più frequente, che è quello di fare legacci da viti e da covoni, nonchè cordicelle per confezionare il sartame delle tonnare. Ricordata da Plinio come «*herba, quam Siculi vocant Ampelodesmon*», venne denominata dal Link, nel 1827, *Ampelodesma tenax*, e da Durand e Schinz, nel 1895, *Ampelodesma mauritanica*.

Sulla macerazione microbiologica di questa pianta, non mi consta che siano state eseguite finora esperienze degne di rilievo. Bredemann (2), che elenca ben 90 piante esaminate, omette il nome dell'*Ampelodesma*.

Dal punto di vista chimico, invece, importanti esperienze sta svolgendo

---

(\*) La *macerazione biochimica* è stata intesa finora nel senso che, in presenza di materiale cellulosico resistente all'attacco di microrganismi specifici, l'azione dell'alcali dovesse servire soltanto a rammollire il materiale, per farlo quindi (dopo abbondante e prolungato lavaggio con acqua) attaccare dai pectici in ambiente pressochè neutro.

il Prof. Palazzo (3) onde utilizzare le piante annuali quali sorgenti di cellulosa. L'illustre Autore così si esprime:

«Il materiale da noi sperimentato proveniva in parte dal territorio di Caltagirone (prov. di Catania), in parte dal territorio di Avola (prov. di Siracusa), dove era stato appositamente mietuto nell'estate scorsa.

«Data la grande affinità della pianta con lo sparto, anche nei riguardi di quelle applicazioni che dipendono dai caratteri delle fibre, doveva sembrare ovvia la possibilità di utilizzarla per la fabbricazione della cellulosa, applicando il processo tipico alla soda o quello al solfato, quali s'impiegano all'estero per la lavorazione dello sparto africano, oppure il processo Cataldi-Pomilio ad alcali e cloro. Ma, per quello che abbiamo già rilevato a proposito di quest'ultimo, le nostre esperienze miravano sostanzialmente a limitare il consumo di soda, e con esse abbiamo perciò cercato di isolare una cellulosa greggia applicando un trattamento alcalino piuttosto blando, seguito da altri trattamenti meccanici e chimici (con esclusione del cloro gassoso e dell'acqua di cloro), ed in ultimo quello con la soluzione d'ipoclorito di calcio.

«Il trattamento alcalino, destinato soprattutto a predisporre il materiale all'azione di altri reattivi, si effettuava con liscivie molto deboli, contenenti solo 1% NaOH, e perciò alquanto più diluite delle liscivie adoperate nel processo Cataldi-Pomilio per la lavorazione dello sparto, le quali contengono per solito da 2 a 2,5 % di soda caustica. Così pure erano diverse le condizioni di temperatura, giacchè nel suddetto processo la lisciviazione viene eseguita a temperatura inferiore a 100°, mentre nelle nostre esperienze il trattamento alcalino avveniva a temperatura più alta, operando sotto la pressione di 2-2,2 atmosfere.

«... Mentre con simile trattamento il nostro materiale era sufficientemente predisposto all'azione successiva di altri reattivi, ma molto lontano ancora da quel grado di disincrostazione che può competere ad una cellulosa industriale, sia pure nello stato greggio, cuocendo in modo analogo la stessa materia prima con una soluzione d'idrato sodico di concentrazione doppia, ossia al 2, abbiamo ottenuto un prodotto che riteniamo possa trovare utile applicazione anche come tale, e cioè, come « mezza-pasta », analoga ai prodotti che possono attenersi dalle varie paglie con l'impiego di calce, ma di colorito più chiaro, e di solidità maggiore ».

Da quanto sopra appare evidente che, oltre all'azione dell'alcali, interviene anche quella del calore, fino a raggiungere le due atmosfere di pressione.

Il materiale da noi adoperato proveniva dal mercato di Randazzo (provincia di Catania), dove è noto col nome volgare di « ligamello », dal largo uso che se ne fa per legare i tralci delle viti, ed era rappresentato da foglie lineari, lunghissime (raggiungenti fino 1 metro e mezzo) convolute, tenaci, ruvido-taglienti al margine.

Le prove di macerazione colla ginestra, utilizzando alcuni fra i ceppi alcali-tolleranti isolati, miravano ad osservare se l'epidermide e la cuticola delle vermene, resistenti alla macerazione rustica o industriale (culture pure di pectici aerobici o anaerobici) potessero essere attaccate, e quindi facilmente liberate, dopo essiccazione, colla sola operazione della *scotolatura*.

È noto, infatti, come la ginestra — per la struttura anatomica dei suoi fusti — si accosti più alla ramia che al lino ed alla canapa, per la resistenza dell'epidermide e della cuticola alla macerazione biologica. Si sa, inoltre, che la *scotolatura* della ginestra macerata e seccata richiede maggiori sforzi della *scotolatura* della canapa e del lino, che non ha altro scopo che di allontanare il legno dalle fibre, ossia dividere due materie molto eterogenee: mentre che l'epidermide della ginestra si toglie bene solo con una *pettinatura*, operazione che ha altra finalità, e cioè quella di togliere le fibre corte o recise.

Del resto, anche la macerazione rustica è già per conto proprio (almeno in Calabria e in Basilicata), una operazione non solamente biologica (macerazione all'acqua corrente o stagnante), ma anche fisico-chimica, richiedendo una bollitura preventiva dei rami.

In quanto ai processi di macerazione usati per la ginestra, Trotter (4) riferisce che esperienze di carattere industriale avrebbero dato risultati soddisfacenti con il trattamento seguente: lessiva al 20 % di soda caustica in rapporto al peso del vegetale secco; pressione di 3-4 kg.; durata della cottura 6 ore; imbianchimento al 15% di cloruro di calce.

Sulla macerazione chimico-microbiologica della ginestra, Rovesti (5) così si esprime:

« È stato rilasciato il brevetto industriale n. 361938, in data 8 agosto 1938, a Federico Chiarabba di Milano per un processo di macerazione enzimatica della ginestra e altre fibre tessili, secondo il quale gli inconvenienti del processo di macerazione microbiologica sarebbero eliminati, in quanto si fa subire al materiale da macerare un trattamento chimico a temperatura ordinaria, o leggermente aumentata, con soluzioni molto diluite di sostanze chimiche tali da intaccare leggermente le parti protettive degli steli delle piante, per consentire una penetrazione degli agenti microbiologici entro gli steli stessi, così che la macerazione possa aver luogo in modo completo.

« Un leggero aumento della temperatura renderebbe più rapido questo trattamento chimico preventivo. Si realizzerebbero così tutti i vantaggi della macerazione enzimatica, mentre si renderebbe possibile il trasporto ai centri di raccolta della fibra greggia, anziché delle fascine di steli che sono molto voluminose. Le fibre sono poi sciacquate in soluzioni chimiche proprie, per impedire che esse si incollino fra di loro durante l'essiccazione. Questa operazione di sciacquatura non è però necessaria.

« Esempio: in una fossa riempita di acqua si aggiunge 0,3% circa di carbonato sedico in polvere, sul volume totale del liquido. Si immergono quindi le fascine di rametti di ginestra, e si mantengono completamente sommerse mediante pietrame. Dopo quarantotto ore le fascine vengono tolte e lavate con acqua; quindi passate al macero microbiologico.

Dopo questa macerazione si lavano con soluzione acquosa al 0,1% di formalina o di allume di rocca, perchè abbia luogo una coagulazione degli ultimi residui di collosità fra le fibre ».

Ma quella che oggi ha preso il sopravvento è indubbiamente la *macerazione chimica* perchè più rapida, e per la difficoltà — come abbiamo ricordato innanzi — che presentano i rametti di liberare la fibra dalla resistentissima pellicola corticale.

« È verso l'uso esclusivo della soda caustica (idrato sodico) — scrive Ro-vesti — che si è orientata l'industria della ginestra, ed infatti, con questo re-agente, si ha una macerazione che non abbisogna di maciullatura, di scotola-tura e di schiacciamento dei rametti e che è rapidissima, perchè può durare un'ora al massimo. Tale macerazione che più propriamente deve nominarsi fisico-chimica, si realizza facendo bollire i rametti in caldaie a superficie libere o sotto la pressione di atmosfere 1-1 ½ (autoclavi) e riempite per circa ¾ del loro volume di acqua nella quale sia stata sciolta la soda caustica. La pro- porzione della soda è variabile alla stregua dell'età dei rametti, ma general- mente, prendendo ad esempio un quantitativo di essi di 3 quintali, occor- rono 30 Kg. di soda sciolta in 1.500 litri di acqua. Terminata la macerazione, nelle stesse caldaie o autoclavi, si compiono poi successivamente altre cinque macerazioni aggiungendo ogni volta il liquido residuo di altri 15 Kg. di soda caustica e di 150-170 litri di acqua. In ognuna delle caldaie o delle auto- clavi, compiute le sei macerazioni, rimangono circa 1.500 litri di acqua non più razionalmente utilizzabile per altre macerazioni. Alcuni aggiungono anche ad ogni ettolitro di soluzione sodica da 20 a 30 gr. di comune colla da falegname ».

Secondo Antoniani (6), per la ginestra, il procedimento chimico sarebbe l'unico capace di consentire un integrale sfruttamento della materia prima. L'A., però, non si nasconde che la macerazione chimica porta a perdite assai forti di alcali, in dipendenza della cospicua quantità di liscivia che impregna e aderisce alla massa di vermene cotte, al momento della loro estrazione dalla caldaia. E questa liscivia, andando direttamente alle vasche di lavaggio, sfugge ad ogni possibilità di recupero.

Nella Campania, per quanto ci consta, lavorano col procedimento chi- mico tre Stabilimenti, e precisamente:

- 1) S.T.O.L.A. - Società Tessiture Ottavianesi Lanza An., in Ottajano (Napoli);
- 2) Gennaro Boccia, in Terzigno (Napoli);
- 3) S. A. Meridionale Fibre Autarchiche (S.A.M.F.A.), Napoli, con Stabilimento in Avella (Avellino).

\*\*\*

Prima di esporre i risultati delle esperienze eseguite coi tralci di vite, coll'ampelodesma e colla ginestra, crediamo opportuno di riportare i princi- pali caratteri morfologici, colturali e biochimici di due microbi alcali-tolle- ranti, fra quelli isolati dalle liscivie di rifiuto della lavorazione della cellu- losa col metodo cloro-soda, nel primo contributo (1).

## MICROORGANISMO 1.

### PROPRIETÀ MORFOLOGICHE E CULTURALI

*Aspetto microscopico.* - Batteri mobili, delle dimensioni medie di  $\mu$  1,9x0,4. Possono però assumere la forma di lunghi filamenti, i quali ap- paiono numerosi soprattutto nei substrati con reazione decisamente alcalina, per aggiunta di carbonato sodico.

*Colorabilità.* - Buona coi colori basici di anilina, ed anche con eritrosina fenicata. Non resiste al Gram.

*Comportamento rispetto all'ossigeno e alla temperatura.* - Aerobio; si sviluppa bene sia in termostato che alla temperatura dell'ambiente. *L'optimum* è 34°-35° C.

*Infissione su gelatina ordinaria.* - Sviluppo scarso, anche dopo molti giorni, e assenza di fluidificazione.

*Strisciamento su agar comune* (pH = 7,0). - Sviluppo discretamente abbondante, con formazione di patina poco rilevata, bianchiccio-sporca, a consistenza butirrosa, con margini lobato-sinuosi, un po' rilevati, e a lucentezza grassa.

*Strisciamento su agar comune-alcantino* (1,5 di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). - Sottile patina mucosa, a lucentezza umida. Al microscopio predominano le forme lunghe con tendenza a raggomitolarsi

*Brodo comune* (pH = 7,0). - Dopo 72 ore a 34° C., liquido torbido, senza velo superficiale. Assenza di deposito al fondo. Al microscopio, con preparato a fresco, piccoli batteri isolati ed anche lunghi filamenti, che fanno ricordare il *Plocamobacterium bulgaricum* L. et N., dotati di movimento serpeggiante.

Nel preparato colorato con fucsina diluita 1 : 5, i lunghi filamenti risultano formati da corti batteri e sono avvolti da una capsula mucilagginosa, che rimane sbiadita rispetto al rosso vivo delle cellule batteriche.

*Brodo comune, con aggiunta dell'1% di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.* - Dopo una settimana di incubazione a 34° C., sviluppo più abbondante che in brodo comune, con tendenza, da parte dei batteri, ad assumere la forma di lunghi filamenti. Questi, dopo 40 giorni di termostato, tendono per lo più ad intrecciarsi a gomitolo, ed il liquido diventa alquanto mucilagginoso e filante. Aumentando, progressivamente fino al 2%, il carbonato di sodio nel substrato nutritivo, lo sviluppo del microorganismo appare dapprima più lento, e poi alquanto stentato, con comparsa di forme atipiche, difficilmente colorabili e che fanno pensare a cellule morte o in via di disfacimento (si veda fig. 2).

*Latte* (pH = 6,5). - Sviluppo scarso o nullo, e assenza di coagulo. Nessun cambiamento nella reazione dopo 7 giorni di termostato a 34° C.

*Infuso di canapa, con frammenti* (pH = 6,8). - Sviluppo scarso e macerazione appena incipiente dopo una settimana di termostato a 34° C. Il grado di macerazione non progredisce nemmeno dopo 10 giorni.

*Infuso di canapa, con frammenti sterilizzati con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e aggiunta del 0,2% di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (\*).* - Sviluppo abbondante, e macerazione dopo una set-

---

(\*) Si è voluto di proposito eliminare la sterilizzazione con l'autoclave, la quale di per se tende a modificare la struttura dei frammenti vegetali.

La sterilizzazione a freddo con perossido d'idrogeno al 3%, e successivo abbondante lavaggio con acqua sterile, è largamente usata nel nostro Istituto per le esperienze sulle tessili, ottenendo sempre ottimi risultati dal punto di vista della sterilità, rilevati dai controlli su patata e in brodo. La soluzione di carbonato di sodio veniva preparata separatamente e distribuita in tubi, ai quali, dopo sterilizzazione in autoclave, venivano aggiunti, colle dovute precauzioni dell'asepsi, i frammenti di canapa sterilizzati a freddo.

timana a 34° C. (\*\*). Al microscopio, con preparato a goccia pendente, batteri mobilissimi, dotati di movimento serpeggiante. Accanto alle forme di dimensioni medie ( $\mu$  1,9x0,4), ve ne sono altre formanti lunghi filamenti, che, colorati sia con colori basici (fucsina Ziehl dil. 1 : 5) che con colori acidi (eritrosina fenicata), mettono in evidenza le stesse caratteristiche riscontrate in brodo comune, e cioè sdoppiamento in corti batteri, i quali risultano av-volti da una sottile capsula mucilagginosa. Nei preparati fatti dopo quindici giorni predominano le forme lunghe, senza assumere però la forma di go-mitolo come avviene in presenza di dosi maggiori di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

*Patata comune, in tubo di Roux.* - Assenza di sviluppo.

*Patata alcalina.* - Modificando la naturale reazione acida della patata (immergendo i tasselli in soluzione di carbonato sodico al 2% fino a far assumere ai medesimi un color cioccolato-chiaro, dopo la sterilizzazione all'autoclave), si ha sviluppo uniforme e abbondante su tutta la superficie dello striscio, con formazione di patina a lucentezza grassa, che, asportata con l'ansa, ha un colore tendente al marrone. Al microscopio, predominano i piccoli batteri. Le forme lunghe non raggiungono mai le dimensioni che si notano nei substrati liquidi alcalini.

RESISTENZA AGLI AGENTI FISICI. - La resistenza al calore è stata provata sottoponendo il microorganismo all'azione del calore secco e del calore umido, mentre le prove di essiccamento venivano fatte imbevendo delle striscioline di carta bibula sterili con brodocoltura di 72 ore bene emulsionata. Le striscioline, contenute in scatola Petri sterili, venivano quindi essiccate in un comune essiccatore ad acido solforico, tenuto a temperatura ambiente ed allo scuro.

Nella tabella 1 sono riportati i vari risultati ottenuti.

#### ATTIVITÀ CHIMICHE.

Omettiamo la descrizione dei metodi seguiti perchè troppo noti. Per ciò che riguarda produzione di idrogeno solforato, di indolo e di fenolo, è risultato positivo soltanto il primo prodotto.

In quanto agli enzimi presi in considerazione (amilasi, invertina, catalasi, presame, tripsina, pectinasi, pectolasi), si è notata soltanto produzione di catalasi.

Per la ricerca della *pectinasi* del Jones (7) (capace di sciogliere la lamella mediana del *sisaro* nelle colture del suo *B. carotovorus*) si è seguito il metodo basato sulla separazione delle culture viventi dai loro prodotti mediante candele di Chamberland e la pressione della pompa Gay-Lussac, facendo agire

---

(\*\*) È noto come la stessa quantità di  $\text{Na}_2\text{CO}_2$ , aggiunta in provettoni contenenti acqua e frammenti setici di canapa, sia capace di abbreviare sensibilmente il tempo di macerazione della tessile se i provettoni sono tenuti ad una temperatura di 32-34° C. La medesima dose di alcali, d'altra parte, può da sola macerare la canapa in tubi, se questi ultimi vengono sottoposti all'azione dell'autoclave a 120° C. per 20 minuti. Non altrettanto avviene, invece, quando l'alcali si trova in presenza di frammenti di canapa sterilizzati a freddo con  $\text{H}_2\text{O}_2$ : la sua azione sulle sostanze pectiche si svolge più lentamente, e si protrae più o meno a lungo a seconda della dose di alcali e della temperatura di incubazione.

TABELLA I

Età coltura (mesi)	TEMPERATURA AMBIENTE			CALORE SECCO				CALORE UMIDO				ESSICCAMENTO			
	Substrato nutritivo	Substrato usato nei passaggi	Esito sviluppo Temperatura	Stufa a secco (gradi centigr.)	Durata riscaldamento (minuti)	Substrato usato per lo sviluppo	Esito sviluppo per lo sviluppo	Temperatura bagnomaria (gradi centigr.)	Durata riscaldamento (minuti)	Substrato usato per lo sviluppo	Esito sviluppo	Apparecchio usato	Durata essiccamento (giorni)	Substrato usato per lo sviluppo	Esito sviluppo
3	brodo comune (pH = 7,0) brodo comune (+1 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Patata alcalina in tubo di Roux	+	45	10 <sup>1</sup>	Patata alcalina in tubo di Roux	+	45	10 <sup>1</sup>	Patata alcalina in tubo di Roux	+	Essicatore ad acido solforico	5	Brodo comune (pH = 7,0)	+
					30 <sup>1</sup>				30 <sup>1</sup>						
					60 <sup>1</sup>				60 <sup>1</sup>						
5	brodo comune brodo comune (+1 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )		+	50	10 <sup>1</sup>		+	50	10 <sup>1</sup>		+		10		+
7	brodo comune brodo comune (+1 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )		+	55	10 <sup>1</sup>		+	55	10 <sup>1</sup>		+		20		+
9	brodo comune brodo comune (+1 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )		+	60	10 <sup>1</sup>		+	60	10 <sup>1</sup>		-		45		+
			-	65	10 <sup>1</sup>		+	65	10 <sup>1</sup>	-	-		60		+
			-	70	10 <sup>1</sup>		-	-	10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-



il filtrato- sterile su frammenti sterilizzati a freddo, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: il filtrato è risultato sempre inattivo.

Anche le prove eseguite, secondo la tecnica di Carbone (8-9), per la ricerca della *pectolasi*, adoperando pectina liquida della ditta C. Erba, diluita al 10%, hanno dato esito negativo.

Non del tutto chiarito appare ancora, pertanto, il modo d'azione di alcuni microorganismi nell'attacco delle piante tessili. D'altra parte è noto come anche sull'esistenza di vere diastasi pectiche segregate da cellule vegetali non isolate, appartenenti a tessuti ed organi di piante più o meno superiori, veri concetti precisi non si abbiano ancora; nello stesso modo eancora insoluta è la questione della digestione della cellulosa nell'intestino animale, nel senso che ancora non sappiamo la parte che spetti in tale processo ad eventuali enzimi di origine glandulare e quella che spetti alla flora intestinale.

La costituzione chimica delle pectine, d'altronde, è stata stabilita solo ora dai recenti, classici lavori di Felix Ehrlich (10-11), i quali dimostrano come queste possano variare da una pianta all'altra, ed anche per ogni singola pianta o sua parte, a seconda dell'età dei suoi tessuti o di altre circostanze ancora inesplorate.

L'azione sulla lignina e sulla cellulosa è stata saggiata usando il metodo di Waksman e Cordon (12), i quali preparano una miscela ben definita di lignina e cellulosa, versando una soluzione concentrata di lignina in alcool etilico su fibre secche di carta da filtro, ed evaporando quindi l'alcool a 60° C. La miscela di cellulosa-lignina viene -frequentemente agitata durante l'evaporazione dell'alcool, in modo da far ricoprire completamente la cellulosa con la lignina. Due grammi di questa lignina-cellulosa, seccata all'aria, e 100 gr. di sabbia lavata vengono messi in Erlenmeyer da 250 cc., dove si versano 20 cc. di acqua contenente 100 mgr. di NaNO<sub>3</sub>, 100 mgr. di K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mgr. di MgSO<sub>4</sub> e tracce di FeCl<sub>3</sub>. Gli Erlenmeyer vengono, quindi, sterilizzati e insemenzati con culture pure di eumiceti o di schizomiceti.

Gli AA. preparano anche una serie parallela per lo studio sulla cellulosa, mettendo in ogni Erlenmeyer gr. 1,5 di cellulosa e 100 gr. di sabbia, oltre, bene inteso, i sali minerali di cui sopra.

Dopo sei mesi a 28° C., il dosaggio della lignina e della cellulosa non decomposte indicherà la misura del processo di decomposizione posseduto dai microorganismi in esame.

Nelle prove da noi eseguite, non si è avuto decomposizione nè di lignina nè di cellulosa.

I risultati sulla variazione della concentrazione idrogenionica in presenza di idrati di carbonio ed alcoli polivalenti, nonchè quelli del potere fermentativo, sono riportati nella Tab. 2.

Confrontando alcuni caratteri rilevati nel microorganismo da noi isolato coi corrispondenti del *Bacterium faecale alcaligenes* Petruschky, di *Escherichia alcalescens* Ford, e di *Escherichia anindolica* Lembke, si nota quanto appresso:

Microorganismi	Mobilità Coagulazione del latte	Coltura su patata comune a reazione naturale acida	Sviluppo di gas in brodo glucosato	Agar al rosso neutro	Fluidificazione gelatina	Indolo	Osservazioni
Microorganismo 1	+ —(1)	—	—	rosso invariato	—	—	(1) Sviluppo scarso o nullo e reazione invariata.
<i>Bact. faecale alcali- genes</i>	+ —(2)	+ (patina bruna)	—	»	—	—	(2) Sviluppo buo- no, e reazione deci- samente alcalina.
<i>Escherichia alcali- scens</i>	+ —	+ (p. giallognola)	+	»	—	—	
<i>Escherichia anindo- lica</i>	+ +	+ (p. biancastra)	+	decolorato fluorescente	—	—	

Da quanto sopra appare evidente come il *Micror. 1* e il *Bact. faecale alcaligenes* (non prendendo in considerazione le due *Escherichia*, le quali sviluppano gas da glucosio) si differenzino soprattutto per il fatto che, mentre il *Micror. 1* non sopporta i substrati a reazione acida, il *Bact. alcaligenes* li sopporta benissimo, dando luogo ad uno sviluppo rigoglioso su patata comune, facendole assumere un colorito bruno. Lo stesso dicasi per il latte, che viene alcalinizzato da quest'ultimo dopo pochi giorni di termostato a 36°-37° C.

In quanto al *Bact. coli alcaligenes* di Chiari e Löffler (1925) siamo d'accordo con Lipska (13) che tale specie non abbia motivo di esistere perchè l'alcalinizzazione e la decolorazione dell'agar di Endo possono essere causate da influenze biochimiche dei colibacilli e possono aver luogo anche in culture monocitogenetiche.

Il microorganismo 1 si differenzia, poi, sostanzialmente dai ceppi 108, 116 e 134 studiati da Mossevich (14) perchè questi ultimi sono sporigeni, e due di essi fondono anche la gelatina. Il ceppo 116 di Mossevich ha in comune col batterio da noi isolato l'assenza di sviluppo in latte e su patata comune, nonchè assenza di produzione di acidi dagli zuccheri. Anche il ceppo 108 di Mossevich non si sviluppa su patata, ma coagula il latte.

Nè vi è corrispondenza coi cinque ceppi anaerobi facoltativi isolati da Kayser e Delaval (15), asporigeni e mobili del gruppo del *Bact. coli*, capaci, secondo gli AA., di decomporre la pectina, perchè tutti fermentano i monosi e i disaccaridi.

È noto, d'altra parte, come a causa della loro instabilità fisiologica e del loro enorme potere di adattabilità alle più svariate condizioni, molte specie batteriche non si prestino facilmente ad essere determinate e classificate. Così dicasi, per es., per molte specie appartenenti ai generi *Alcaligenes* (\*), *Rhizobium*, *Chromobacterium* e *Phytomonas*.

(\*) Conn, Wolfe e Ford propongono di riunire nella famiglia *Rhizobiaceae* i tre generi: *Rhizobium*; *Chromobacterium*; *Alcaligenes*. Quest'ultimo comprenderebbe i sapro-fiti non cromogeni. Specie-tipo: *Alcaligenes faecalis* (Petruschky) Castellani e Chalmers. I limiti di questo genere sono attualmente imprecisati (alcuni parassiti delle piante, in particolare le specie attualmente denominate *Phytomonas rhizogenes* e *Ph. tumefadens*, sono molto vicine alle specie dei generi *Rhizobium* e *Alcaligenes*).

TABELLA 2

Brodo comune con aggiunta del 2% di	Reazione iniziale (pH)	Età della coltura e concentrazione idrogenionica (temperatura termostato: 34° C.)							Potere fermentativo	Osservazioni
		2 giorni (pH)	3 giorni (pH)	4 giorni (pH)	5 giorni (pH)	6 giorni (pH)	7 giorni (pH)			
		Glucosio . . . . .	7,0	7,0	7,2	7,2	7,2	7,2		
Levulosio . . . . .	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	—		
Galattosio . . . . .	7,0	7,0	7,0	7,3	7,3	7,3	7,3	—		
Saccarosio . . . . .	7,0	7,0	7,0	7,2	7,2	7,2	7,2	—		
Maltosio . . . . .	7,0	7,0	7,2	7,3	7,2	7,2	7,2	—		
Lattosio . . . . .	7,0	7,0	7,2	7,4	7,3	7,4	7,4	—		
Raffinosio . . . . .	7,0	7,0	7,2	7,5	7,4	7,4	7,4	—		
Arabinosio . . . . .	7,0	7,0	6,9	7,0	7,1	7,1	7,1	—		
Xilosio . . . . .	7,0	7,0	7,0	7,2	7,2	7,2	7,2	—		
Destrina . . . . .	7,0	7,0	7,1	7,0	7,2	7,2	7,2	—		
Amido . . . . .	7,0	7,0	6,9	6,9	6,9	6,9	7,0	—		
Mannite . . . . .	7,0	7,0	7,0	7,0	6,9	6,9	6,9	—		
Glicerina . . . . .	7,0	7,0	7,0	6,9	6,9	7,0	7,0	—		

Il microrganismo da noi isolato riteniamo debba rientrare nel nuovo genere *Alcaligenes* proposto da Conn, Wolfe e Ford (16).

## MICROORGANISMO 2.

È un pectinolitico appartenente alla « sammelspecies » *Bac. mesentericus vulgatus* Flügge.

È noto come, fra i microbi mesofili, alcuni di quelli appartenenti al gruppo dei *mesenterici* siano capaci di dissolvere la lamella mediana delle fibre del lino, come hanno messo in rilievo Beijerinck e van Delden fino dal 1904 (17).

Tralasciando la descrizione dei principali caratteri morfobiologici ben noti di questi microbi, ci soffermiamo sul modo di comportarsi del ceppo isolato nelle culture su papata, e sulle sue proprietà pectinolitiche e fermentative.

*Patata a reazione naturale acida, contenuta in tubo di Roux.* - Non sempre si notano gli stessi caratteri circa la forma della patina di sviluppo e il colore più o meno marcato che tende ad assumere il tassello. La tipica forma della patina, a pliche più o meno rilevate e sinuose, e a consistenza mucosa, molte volte appare quasi omogenea e liscia, a lucentezza un po' umida nelle prime 48-72 ore di sviluppo, e solo dopo molti giorni appare una lieve increspatura; talvolta le pliche compaiono subito, altre volte, invece, la patina è sottile e appena appariscente, e la patata acquista un colore marrone più o meno carico. In culture vecchie di 5-6 mesi, si notano spesso dei puntini bianchicci disseminati sulla superficie di sviluppo e sul resto del tassello, che, esaminati al microscopio, risultano formati da ammassi di spore.

Queste variazioni colturali su patata comune sono dovute, evidentemente, alla varietà della patata che si adopera (tuberi a polpa bianca o a polpa gialla, appena estratti dal terreno o di vecchia data, ecc.) nonché alle variazioni dell'ambiente termico. Il che è provato dal fatto che si verificano anche con culture monocitogenetiche.

*Patata alcalinizzata con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  fino a farle assumere un color cioccolato al latte dopo sterilizzazione.* - Lo sviluppo è abbondante, con patina per lo più mucosa, a lucentezza umide con lievi increspature superficiali. Anche qui si possono, però, avere tutte le variazioni riscontrate nella patata naturale per quanto riguarda la conformazione della patina di sviluppo, la quale qualche volta si presenta opaca, esile, con rilievi pressochè nulli. Nelle vecchie colture compaiono spesso, come nelle patate naturali, molti puntini bianchicci (ammassi di spore).

*Patata cruda e sterile in acqua sterile.* - In tubi di acqua sterile si aggiungevano, colle dovute precauzioni dell'asepsi, pezzettini interni di patata, i quali si ricavavano tagliando con coltello rovente i tuberi — previo abbruciamento della superficie esterna dei medesimi alla fiamma di un becco Bunsen — operando sotto un coperchio di campana di Tyndall provvisto di carta bibula imbevuta d'acqua. È ovvio dire che, prima dell'inseminamento, i tubi subivano la prova del termostato ad una temperatura di 37° C. per 48 ore.

In questo substrato lo sviluppo è abbondante, con formazione di mem-

brana superficiale più o meno increspata e resistente allo scuotimento. Dopo 15 giorni di termostato a 34° C., si osserva una lieve dissoluzione del tassello, il che sta ad indicare che il microrganismo in questione è dotato di un certo potere amilolitico.

Mentre le prove eseguite per la ricerca della *pectinasi* del Jones hanno dato esito negativo, quelle fatte usando la tecnica di Carbone per la *pectolasi* hanno dato esito positivo.

Si sviluppa bene negli infusi di canapa e di lino, ed i frammenti vengono macerati dopo 6-7 giorni a 34°-35° C.

Se alla sterilizzazione con l'autoclave viene sostituita quella con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e nel liquido di macerazione si aggiungono piccole dosi (0,2-0,3%) di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> il tempo di macerazione viene sensibilmente ridotto, e il microrganismo si sviluppa abbondantemente tollerando molto bene l'alcali aggiunto (\*).

Le prove fatte sulla lignina e sulla cellulosa, seguendo le istruzioni di Waksman e Cordon, hanno dato esito negativo. Anche prolungando fino a 10 mesi la permanenza degli Erlenmeyer in termostato a 28° C., i risultati non sono stati tali da far ritenere che il microrganismo in questione possa svolgere un'azione decomponente sulla lignina pure, in condizioni che facciano escludere la presenza di liquidi alcalini.

In quanto al potere fermentativo dei principali idrati di carbonio ed alcoli polivalenti, il microrganismo ha dato i seguenti risultati, rilevati dopo una settimana di incubazione a 34° C.

*Agar-glucosio e brodo comune glucosato* (pH = 7,0). — L'infissione in agar ha dato sviluppo abbondante di patina superficiale con pliche poco rilevate, di color marrone chiaro; assenza di gas. Il terzo superiore del tubo ha assunto un colore più marcato. In brodo, liquido torbido e assenza di bollicine. Concentrazione idrogenionica = pH 6,9.

*Agar e brodo comune più levulosio* (pH = 7,0). — In agar, sviluppo discreto in superficie con patina molto lievemente increspata solo al punto d'infissione; assenza di gas. In brodo, liquido poco torbido, con sottile patina superficiale a pliche appena incipienti; assenza di bollicine; pH = 7,0.

*Agar e brodo comune più galattosio* (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie, con pliche discretamente rilevate. Il terzo superiore dell'agar si è colorato in marrone scuro; assenza di gas. In brodo, abbondante sviluppo superficiale e assenza di bollicine; pH = 7,6.

*Agar e brodo comune più maltosio* (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie, con pliche molto rilevate, di colore tendente al marrone; colore dell'agar accentuato verso il marrone scuro nel terzo superiore del tubo; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine e sviluppo abbondante in superficie; pH = 7,4.

*Agar e brodo comune più saccarosio* (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie, con pliche un po' meno rilevate che in agar-maltosio;

(\*) Coltivato in brodo comune, con aggiunta del 0,6 e 0,8 % di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, si è sviluppato in tutti i tubi con abbondante membrana superficiale, bianchiccia, increspata, e alquanto resistente all'agitazione. Solo in tubi contenenti l'1% di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lo sviluppo è stato alquanto stentato, con scarsa membrana superficiale, lievemente increspata.

assenza di gas. In brodo, niente bollicine, liquido poco torbido e abbondante sviluppo superficiale; pH = 7,2.

*Agar e brodo comune più lattosio* (pH = 7,0). - In agar sviluppo superficiale piuttosto scarso, con patina sottile e poco increspata, di color bianchiccio-sporco; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine, liquido limpido, e patina superficiale sottile e a pliche appena visibili; pH = 7,4.

*Agar e brodo comune più raffinioso* (pH = 7,0). - In agar, sviluppo abbondante in superficie; con pliche rilevate, di color bianchiccio-sporco ai bordi, e marrone chiaro al centro, in corrispondenza del punto d'infissione; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine, liquido limpido e abbondante patina superficiale lievemente increspata; pH = 7,6.

*Agar e brodo comune più mannite* (pH = 7,0). - In agar, sviluppo buono in superficie, con patina poco rugosa, tinta tendente al marrone scuro nel quarto superiore dell'agar; assenza di gas. In brodo, assenza di bollicine, liquido un po' torbido, e abbondante patina superficiale; pH = 7,2.

## ESPERIENZE ESEGUITE COI TRALCI DI VITE, COLL'AMPELODESMA. E COLLA GINESTRA

La difficoltà che oppongono i tralci, sia allo stato ancora verde che allo stato secco, ad essere attaccati dai microrganismi, ci ha indotto a sottoporre i sarmenti all'azione preventiva di NaOH al 16% per 48 ore, seguito da abbondante lavaggio con acqua del Serino, prima di trattarli nel modo come appresso. Tale trattamento ci ha già dato soddisfacenti risultati in esperienze analoghe eseguite su tralci provenienti dalla Tunisia (18), per una eventuale loro pratica utilizzazione onde arricchire di sostanza organica le estese zone viticole possedute dagli Italiani colà residenti.

Dopo l'azione preventiva dell'idrossido di sodio, si dava corso alle seguenti esperienze.

### ESPERIENZA I.

Si adoperavano tralci di Sangiovese, sia allo stato ancora verde che secco, e ridotti a truciolini colle modalità usate nel primo contributo. Si preparavano 12 vasche rettangolari di vetro (munite di coperchio di vetro non perfettamente aderente ai bordi), delle dimensioni di cm. 30 x 20 x 25, si lavavano internamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 12 volumi insieme colla lastra di copertura, si lasciavano sgocciolare, e si versavano in ciascuna i seguenti quantitativi di liquido da macero: nelle prime sei vasche litri 4 di liscivia di « Effluente A » (\*) diluita 1 : 1; nelle rimanenti sei la medesima quantità e qualità di liscivia, però diluita 1 : 2.

Le vasche, numerate da I a XII subivano quindi il seguente trattamento:

---

(\*) Trattasi di liscivie di rifiuto della lavorazione della cellulosa col metodo cloro-soda. Le liscivie provenivano dal Sindacato Cellulosa Pomilio, ed erano di due qualità: una denominata « Effluente A » con assenza di cloro-derivati, e l'altra « Effluente C » con presenza di cloro-derivati. Riguardo al contenuto in sostanza organica, azoto e anidride fosforica, un campione di queste liscivie, sottoposto all'analisi chimica, dava i seguenti risultati centesimali: sostanze organiche 34,21; azoto totale 0,46; anidride fosforica 0,11. La soda vi era contenuta in quantità di circa 0,8 %.

I, II, VII, VIII contenenti gr. 200 di truciolini ancora verdi venivano insemenate con miscela batterica; III, IV, IX, X contenenti gr. 200 di tralci secchi, venivano insemenate anch'esse con miscela batterica; V e XI contenevano soltanto gr. 200 di truciolini verdi (controlli); VI e XII gr. 200 di truciolini secchi (controlli).

Le vasche si ponevano in camera-termostato a 30° C. e due volte al mese si facevano le osservazioni microscopiche e quelle relative al grado di decomposizione dei truciolini.

Dopo 15 giorni non si notarono fatti degni di rilievo nelle vasche contenenti la miscela batterica, nè in quelle controllo. Soltanto dopo un mese si poté constatare che lo sviluppo microbico era più rigoglioso nelle vasche contenenti tralci messi allo stato ancora verde, e ciò sia con liscivia diluita 1 : 1 che con liscivia diluita 1 : 2. Evidentemente l'aggiunta di tralci verdi nelle liscivie tende a correggere la reazione delle medesime, data la natura acida dei succhi vegetali, con sensibile beneficio dello sviluppo batterico e, pertanto, non si è notata una sensibile differenza fra le due diluizioni adoperate.

Dopo due mesi, però, la maggiore concentrazione della liscivia (anche per effetto della evaporazione dell'acqua) non tardò a far sentire la sua azione sullo sviluppo microbico, che prese a stabilizzarsi nella diluizione 1 : 1, prendendo un decisivo sopravvento la diluizione 1 : 2, e ciò tanto nelle vasche contenenti tralci allo stato verde che in quelle contenenti tralci allo stato secco. Le osservazioni microscopiche rivelarono sviluppo preponderante dei due microrganismi insemnati, oltre, bene inteso, ad altre forme banali per inquinamento accidentale attraverso la chiusura non ermetica del coperchio, il quale, per evidenti ragioni di aerobiosi, era costituito da una semplice lastra poggiate sull'orlo, non perfettamente levigato della vasca.

A tali forme banali andavano aggiunti, peraltro, alcuni bacilli originatisi da spore preesistenti sui frammenti di tralci e non distrutte dal trattamento preventivo con Na OH al 16 %.

L'esame dei truciolini rivelava un debole grado di rammollimento, presentandosi ancora alquanto duri alla dissezione cogli aghi, sia per la parte corticale che per quella legnosa.

Dopo tre mesi si notò un sensibile aumento di sviluppo nella membrana superficiale, dovuta soprattutto ad uno dei due microrganismi insemnati, oltre a qualche ceppo inquinante. Fra questi ultimi, in due vasche si notarono efflorescenze bianchiccie dovute ad actinomiceti.

La parte legnosa dei tralci, però, era ancora dura, sia per quelli messi allo stato verde che per quelli secchi.

Soltanto dopo 5 mesi si poté raggiungere un discreto grado di rammollimento dei tralci in modo da ottenere una mezza-pasta tritutando i truciolini in un mortaio con un po' di acqua.

Le figure 3 e 4 indicano lo stato di disgregazione raggiunto dal materiale delle vasche VII e VIII, contenenti tralci ancora verdi e liscivia diluita 1 : 2.

Nelle vasche-controllo scarsa microflora, costituita da ceppi per lo più sporigeni, e sviluppo superficiale di feltri fungini. In quanto al grado di de-

composizione dei truciolini, dopo 5 mesi di termostato a 30° C., sia la parte corticale che quella legnosa presentavano soltanto una lieve degradazione, dovuta soprattutto al trattamento preventivo con soda. I truciolini provenienti da tralci ancora verdi risultavano più intaccati nella parte legnosa rispetto a quelli appartenenti a tralci secchi.

#### ESPERIENZA II.

Si allestivano 24 provettoni, contenenti cmc. 25 di decotto di tralci (\*), e, dopo sterilizzazione, si aggiungevano in ognuno gr. 2 di truciolini già trattati con soda al 16% per 48 ore, e lavati abbondantemente con acqua del Serino prima, e poi con acqua sterile. I primi 12 provettoni contenevano truciolini di tralci ancora verdi, e gli altri truciolini secchi. Per ogni gruppo di 12, si usavano le seguenti modalità: 4 provettoni contenevano il 0,3 % di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , più miscela batterica, altri 4 contenevano il 0,5% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , più miscela batterica; due il 0,3% e due il 0,5% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , (controlli).

I provettoni si ponevano in termostato a 30° C. e si esaminavano ogni 15 giorni.

Anche in questa esperienza soltanto dopo 5 mesi si potè notare un soddisfacente grado di decomposizione nei tralci dei provettoni contenenti il 0,5% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

I tralci messi allo stato ancora verde sembravano un po' meno resistenti al trattamento cogli aghi da dissezione, rispetto a quelli messi nei provettoni allo stato secco. Abbondante lo sviluppo dei due microrganismi, con patina superficiale del mesenterico. Nei provettoni-controllo, scarsa microflora, dovuta soprattutto a sporigeni, e attacco del legno appena incipiente.

Le figure 5 e 6 dimostrano lo stato di disgregazione raggiunto dopo 5 mesi dal materiale dei provettoni contenenti tralci allo stato ancora verde e soluzione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , al 0,5 %.

\*\*\*

Data la notevole quantità di silice nelle foglie di ampelodesma, queste venivano sottoposte ad uno speciale trattamento chimico prima di subire l'azione dei microbi alcali-tolleranti. E, precisamente, in una bacinella di vetro si versavano litri 14 di acqua del Serino, si aggiungeva il 0,7% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  del commercio, e, dopo soluzione a freddo, si mettevano sommerse le foglie di ampelodesma (gr. 170). Si poneva una lastra di vetro sulla bacinella, e si lasciava a temperatura ambiente (15° C.), facendo delle osservazioni periodiche ogni dieci giorni. Dopo quaranta giorni, si notava in superficie una sottile pellicola, che, esaminata al microscopio, rivelava ricca flora microbica, nonchè protozoi varii, appartenenti per lo più ai *Ciliophora*. In quanto alla silice, non era stata del tutto eliminata, ma ciò nonpertanto, si ritenne opportuno togliere dal macero l'ampelodesma, per evitare che microrganismi dannosi potessero agire sfavorevolmente sulla resistenza delle fibre, le quali, d'altra parte, erano già sottoposte all'azione dell'alcali, per quanto quest'ultimo in quantità non rilevante.

---

(\*) Gr. 50 di tralci, ridotti finemente con una macina elettrica si ponevano in Erlenmeyer con 500 cc. di acqua del Serino, si tenevano in autoclave per 30 minuti ad un'atmosfera, si filtrava quindi il decotto e si portava a 1000 cmc.



Lavate abbondantemente con acqua del Serino, le foglie di ampelodesma venivano asciugate in stufa, divise in 4 Erlenmeyer, e trattate come segue:

1) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile, e insembramento con un bacillo pectico aerobico del gruppo *B. asterosporus*;

2) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile contenente il 0,4% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , e insembramento con miscela dei due microrganismi;

3) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile contenente il 0,6% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , e insembramento con miscela dei due microrganismi;

4) gr. 40 in un litro di infuso di canapa sterile contenente il 0,6% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (controllo).

Le bacinelle si ponevano in termostato a 30° C.

Le osservazioni sul grado di decomposizione pectica raggiunta dalle foglie di ampelodesma venivano eseguite ogni dieci giorni, non trascurando di saggiare anche la resistenza alla trazione dei fasci fibrosi, la quale poteva esser compromessa da una prolungata sommersione in macero alcalino.

Il materiale della bacinella 1, anche dopo due mesi di permanenza in termostato, presentava le cellule superficiali ricche di silice ed una macerazione solo appena incipiente.

Il materiale, invece, delle bacinelle 2 e 3, dopo lo stesso periodo di tempo, liberatosi dalla maggior parte della silice, presentava un soddisfacente grado di macerazione. Specialmente nella bacinella 3, il decorso della macerazione (\*) è risultato più rapido e più completo, benchè il materiale fosse ancora alquanto gommoso al tatto, non essendo liberato del tutto dalle sostanze pectiche. Tuttavia, non si è ritenuto opportuno lasciare ancora nel macero le foglie di ampelodesma, per la già diminuita resistenza dei fasci fibrosi in seguito alla lunga sommersione nell'infuso alcalino.

Lo sviluppo microbico nelle bacinelle 2 e 3 era abbondante, con sottile patina superficiale, dovuta soprattutto al mesenterico alcalii-tollerante.

Le figure 7, 8 e 9 indicano tre diversi stadi delle foglie di ampelodesma dopo il macero alcalino. E, precisamente, la fig. 7 rappresenta lo stato delle foglie dopo un mese di permanenza a temperatura ambiente (15° C.) in soluzione acquosa al 0,7% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , e successivo lavaggio con acqua di condotta; la fig. 8 rappresenta il grado di macerazione raggiunto dopo 2 mesi in infuso di canapa alcalinizzato al 0,4% con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e insembrato con miscela batterica; la fig. 9 indica il grado di macerazione raggiunto dopo 2 mesi in infuso di canapa alcalinizzato al 0,6% con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e insembrato con miscela batterica.

Il materiale della bacinella-controllo, dopo due mesi, presentava solo un accenno di macerazione.

\*\*\*

Le prove sulla ginestra venivano eseguite attenendoci ai seguenti accorgimenti: si adoperavano vasche di vetro, sterilizzate a freddo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a

---

(\*) O *pseudomacerazione*, secondo la terminologia del compianto Prof. Carbone (8-9) ogni qualvolta si richieda un successivo energico lavaggio del materiale, accompagnato da sfregamento.

12 vol. e quindi lavate con acqua sterile, insieme con la lastra di copertura, la quale, d'altra parte, non impediva che l'aria potesse penetrare nell'interno attraverso le naturali piccole screpolature esistenti sull'orlo dei recipienti. Le vermene erano allo stato secco, e si adoperavano sia intere che schiacciate, sterilizzate con  $H_2O_2$  ovvero allo stato naturale, settiche. E, precisamente, le esperienze venivano condotte secondo lo schema indicato per ognuna.

*Esperienza I.* — Gr. 90 di vermene intere e sterili venivano messe in litri 4 di acqua del Serino e insemenate con un bacillo peptico aerobico del gruppo *B. asterosporus*. La medesima quantità di vermene sterili, però schiacciate, veniva collocata in un'altra vasca e trattata collo stesso microrganismo. Una terza vasca conteneva gr. 90 di vermene schiacciate, però settiche, e litri 4 di acqua (controllo).

*Esperienza II.* — Gr. 90 di vermene intere e sterili venivano messe a macerare in 4 litri di acqua del Serino addizionata del 0,3 % di  $Na_2CO_3$ ; una seconda vasca differiva dalla prima soltanto perchè le vermene erano schiacciate. Insemenzamento con miscela batterica alcali-tollerante.

Due altre vasche, contenenti l'una vermene sterili e schiacciate +0,3% di  $Na_2CO_3$ , e l'altra vermene settiche e schiacciate +0,3%  $Na_2CO_3$ , servivano da controlli

*Esperienza III.* — Si seguivano le stesse modalità della esperienza II, colla sola variante che, invece del 0,3% di  $Na_2CO_3$ , veniva aggiunto il 0,4% in ognuna delle quattro vasche.

Tutte vasche si tenevano in termostato a 32° C.

I risultati ottenuti nelle varie macerazioni si possono così riassumere: L'azione del bacillo peptico aerobico del gruppo del *B. asterosporus*, sulle vermene, sia intere che schiacciate, previamente trattate con  $H_2O_2$  e messe a macerare in acqua priva di alcali, si è dimostrata soddisfacente in quanto a potere macerativo (specie con vermene schiacciate), ma la filaccia ottenuta molto difficilmente riesce a liberarsi dai frammenti di epidermide e dalla cuticola colla sola operazione della scotolatura. Lo stesso dicasi per il controllo riguardante vermene schiacciate e settiche messe a macerare in sola acqua (macerazione rustica).

L'azione svolta dalla miscela batterica alcali-tollerante sulle vermene (specialmente in quelle schiacciate e con aggiunta del 0,4% di  $Na_2CO_3$ ) è stata molto efficace, nel senso che ad una più rapida macerazione, rispetto ai controlli contenenti la sola percentuale di alcali, ha corrisposto una buona filaccia, morbida e discretamente resistente, che con la semplice operazione della scotolatura si lascia liberare quasi completamente dai pochi frammenti di epidermide e di cuticola risparmiati dalla duplice azione micro-chimica.

I controlli (maceri rustici alcalini al 0,3 e al 0,4% di  $Na_2CO_3$ ) hanno dato una soddisfacente macerazione, specie nelle vermene schiacciate, ma il periodo di tempo richiesto è stato più lungo (14 giorni al 0,4% di  $Na_2CO_3$ ) rispetto a quello impiegato dalla miscela batterica con materiale sterile (8 giorni con 0,4% di  $Na_2CO_3$  e 10 con 0,3% di  $Na_2CO_3$ ). A ciò si deve aggiungere il minor grado di resistenza della filaccia nei controlli (maceri rustici alcalini) dovuto, evidentemente, oltrechè all'azione dell'alcali, a quella di microrganismi agenti anche sulla cellulosa.

## CONSIDERAZIONI E RILIEVI SULLE RICERCHE PIU' RECENTI DEI VARI AUTORI E CONCLUSIONI.

Le esperienze condotte sui tralci di vite, in questo e nel precedente contributo, hanno avuto di mira soprattutto la eventuale possibilità di adoperare come acqua da macero le liscivie di rifiuto della lavorazione della cellulosa col metodo cloro-soda, le quali, per la notevole quantità di alcali, non possono avere immediata e proficua utilizzazione in agricoltura, pur essendo ricche di sostanze organiche. Le prove eseguite hanno intanto messo in chiaro i seguenti fatti:

1) Le liscivie della lavorazione della cellulosa, specie quelle prive di cloro-derivati, opportunamente diluite, si prestano benissimo come substrati nutritivi per microbi alcali-tolleranti.

2) Fra i microrganismi resistenti a dosi relativamente alte di alcali ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) si debbono annoverare alcuni capaci di esercitare un'azione disintegrante delle sostanze incrostanti la cellulosa. E ciò indipendentemente da quanto possa essere attribuito all'alcali presente.

3) L'essenza legnosa adoperata ha raggiunto un soddisfacente grado di decomposizione dopo 5 mesi a  $30^\circ\text{C}$ ., e previo trattamento per 48 ore con  $\text{NaOH}$  al 16 %. Bene inteso, l'alcali occorrente per il trattamento preliminare dei tralci si può conservare per successivi trattamenti di altro materiale celluloso.

I sarmenti, per la fabbricazione della carta, possono dare, secondo Garoglio (19), un rendimento del 22% a peso umido, ma con fibra troppo corta, poco resistente e di difficile imbiancatura. Secondo Sorgato e Valente (20), la resa in cellulosa, in esperienze da essi condotte è risultata invece di circa il 30% sul vegetale secco, con le seguenti proprietà: tenore in  $\alpha$ -cellulosa da 82 a 92 %, ceneri da 0,3 a 0,6 %, lunghezza della fibra da 0,8 a 1,5 mm., larghezza da 15 a 20  $\mu$ . Gli stessi AA. hanno esaminato un ulteriore sfruttamento dei sarmenti, nel senso di far fermentare i carboidrati contenuti in quantità discreta e risultanti dal processo di estrazione della cellulosa.

Data la dimostrazione sperimentale dell'utilizzazione dei sarmenti, quali materiali celluloseici, che però risultano leggermente inferiori a quelli degli altri residui agricoli, e cioè 30-35 % contro 47 % nell'abete, 42 % nel faggio, 35 % nella paglia, 39 % nei residui fibrosi del sorgo, gli AA. vedono anche un miglioramento nell'economia del processo, con il recupero dai liscivi di cottura della lignina (14-18 %) con tenore in metossile variabile da 9 a 11%, contro 14-16 nell'abete. Operano il recupero dell'amido, con estrazione sistematica, in modo da ottenere il massimo esaurimento del materiale, come la massima concentrazione nel liquido estratto.

Le condizioni di prova realizzate con la costruzione di un piccolo impianto pilota, la cui batteria permette la estrazione sotto pressione ed eventualmente in ambiente acido, furono le seguenti: carico per estrattore 0,8 Kg. di sarmento sminuzzato (rapporto peso: volume 1:4,5), temperatura media  $140^\circ$ , pressione 4 atm., tempo per lo scarico di un elemento di batteria e il successivo circa 45 minuti.

Il giro di batteria, formata di 5 elementi, compiuto in circa 4 ore, nu-

sciva ad effettuare un esaurimento abbastanza spinto, fino ad abbassare nel materiale residuo e nell'ultimo estrattore le concentrazioni di amido a circa 0,5-1 %. La fermentazione procedette regolarmente, previo ambientamento del lievito ai componenti secondari presenti nel sugo, come di solito si usa per i liqui d'idrolisi e di saccharificazione. La resa in alcool si aggira dal 4 al 7 % sul sarmiento secco, a seconda che si tratti di materiale povero o ricco di amido. Il rendimento può essere aumentato se l'estrazione è praticata con soluzione di acido, anzichè con acqua, in modo da idrolizzare parte delle emi-ed idrocellulose. Tuttavia, gli AA. ritengono di dover escudere l'impiego di soluzioni acide diluitissime, nonchè quello della concentrazione di 3-5% di  $H_2SO_4$  a 135-140°, perchè, in quest'ultimo caso, l'aumento in zuccheri fermentescibili diminuirebbe la resa in cellulosa.

Secondo Rotini (21) si possono ricavare 10 kg. di alcoole per quintale di sarmiento secco all'aria, vale a dire una resa di 14% sul sarmiento secco. Questo valore sembra, in verità, eccessivo, poichè comporterebbe l'estrazione acquosa sopra un materiale con almeno 25 % di zuccheri fermentescibili.

Carino-Canina (22) riferisce che i tralci di vite rappresentino una importante materia prima per la produzione di furfurolo, oltre, bene inteso, alla produzione di cellulosa. È noto come il furfurolo sia, fra i prodotti autarchici, uno dei più richiesti, avendo larghe applicazioni nella preparazione di resine sintetiche, di tessuti impermeabili, per migliorare le qualità delle masse plastiche a base di caseina, e per le sue proprietà antidetonanti se aggiunto in piccole proporzioni ai carburanti.

Ad ogni modo, non spetta a noi decidere quale sia la migliore utilizzazione industriale dei tralci di vite. Quelli da noi adoperati hanno dato, alla analisi chimica, i seguenti dati, riferiti a sostanza secca: lignina 27,11 % (metodo Villstätter); cellulosa 31,55% (metodo Cross-Bevan).

Se convenga meglio praticare la distillazione secca per ottenere alcool metilico, acido acetico, acetone, catrame, ecc. (per i quali si preferiscono i legni duri come il carpino e il faggio), o se convenga la utilizzazione per la produzione dell'alcool etilico (20-24) come si fa anche per altri sottoprodotti legnosi, quali segatura di legno, paglia di riso o di grano, tutoli di granturco, bagasse di sorgo, trucioli esausti di castagno provenienti dalle fabbriche di estratti concianti, canapuli non utilizzabili altrimenti, ecc., è una questione che risolveranno i chimici, tenendo nel massimo conto, soprattutto, le esigenze nazionali che fanno preferire un prodotto piuttosto che un altro.

A noi è bastato rilevare il fatto che alcune liscivie ricche di sostanze organiche, che attualmente vanno disperse nel mare, possono acquistare, previa diluizione, una grande importanza in determinate industrie biochimiche, specialmente come acque da macero per materiali cellullosici.

Per quanto riguarda le esperienze eseguite con l'ampelodesma, se si considera che le prove fatte dal Prof. Palazzo hanno richiesto, oltre il trattamento chimico, l'azione dell'alta temperatura fino a 2-2,2 atmosfere per poter realizzare una *mezza-pasta*, i risultati da noi ottenuti possono ritenersi soddisfacenti, soprattutto dal punto di vista economico. Si eliminano, in primo

luogo, le operazioni di cottura, e si possono utilizzare come acqua da macero infusi vegetali alcalini con aggiunta di microbi resistenti alle concentrazioni desiderate, operando in vasche di cemento coperte da teli e durante i mesi estivi, nei quali si può raggiungere naturalmente l'*optimum* di temperatura per i microrganismi che ci interessano. E, in merito a questa microflora, c'è da osservare che, oltre ai veri pectinolitici, possono svolgere un ruolo importantissimo i *pseudomaceranti*, perchè, come ha messo in rilievo anche Sacchetti per la canapa (25), bisogna tener conto del complesso della microflora, sia macerante che banale, perchè quest'ultima può concorrere, specie nei primi momenti, alla demolizione di non poche sostanze.

Per la ginestra — appartenente a quel gruppo di tessili (ramia, gesso, ecc.) nelle quali, senza previo schiacciamento degli steli o asportazione dell'epidermide, i microrganismi incontrano una certa difficoltà a svolgere la loro azione pectinolitica — i risultati sono stati più che soddisfacenti.

Trasportando nel campo industriale le acquisizioni tratte dalle prove di Laboratorio, appare chiaro come la soluzione acquosa al 0,3 di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  si presti benissimo ad una rapida e completa macerazione delle vermene, provocando nei maceri rustici uno sviluppo elettivo e di arricchimento di microrganismi pectinolitici alcali-tolleranti mediante insembramenti massivi di *preculture* fatte in infusi vegetali alcalinizzati.

La semplice operazione della scotolatura sarebbe sufficiente (dopo il lavaggio ed essiccamento del materiale) a liberare l'epidermide e la cuticola dalle fibre, senza sottoporre le vermene ed un'azione preventiva di bollitura o di alcalinizzazione (a temperatura più o meno elevata) e successivo lavaggio, come avviene nella cosiddetta « macerazione chimico-microbiologica » che altro non è se non la macerazione biochimica nel senso antico della parola.

È noto, d'altra parte, come numerose ricerche (eseguite sia in Laboratorio che nella grande industria) abbiano ripetutamente confermato la benefica influenza di apporti alcalini nell'acqua da macero, onde neutralizzare l'acidità che man mano si forma durante il decorso del processo macerativo. Così, il Dott. Schaefer (25) della Ditta Gruschwitz di Neusalz a. O., ha potuto dimostrare come, neutralizzando con calce, o meglio con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , la durata della macerazione del lino possa ridursi da 120 a 75 ore, migliorando, non solo la resa, ma anche la qualità del taglio.

Occorre, peraltro, tenere sempre nella massima considerazione le antiche esperienze dello Störmer (26), quelle più recenti del Ruschmann (27), dell'Habermann (28), e di altri ancora, dalle quali emerge la seguente osservazione fondamentale:

In tutti i tipi di macerazione rustica si ha produzione di acidi organici in quantità più o meno notevole, a seconda del materiale fermentescibile e persistendo, soprattutto, le condizioni di anaerobiosi. Ora, se il potere pectinolitico della flora microrganica è quello che forma l'essenza del processo macerativo subacqueo, un eccessivo sviluppo di microflora acidogena ed acidotollerante, è evidentemente, in contraddizione col buon esito della macerazione, perchè gli acidi menomano la solidità della fibra e la rendono meno atta alla filatura.

## RIASSUNTO

Si sono eseguite ulteriori esperienze sulla degradazione dei tralci viticoli, utilizzando alcuni fra i ceppi alcali-tolleranti isolati. I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti, sia per il grado di decomposizione raggiunto dai tralci, sia per la possibilità di utilizzare, nella grande industria, abbondanti quantità di liscivie di rifiuto, che attualmente vanno disperse.

Buoni risultati si sono avuti, altresì, con altre piante (*Ampelodesma mauritanica* Dur. e Schinz, e *Spartium junceum* L.), che, per la presenza di silice o per altre cause, non si erano prestate finora ad una buona macerazione microbiologica, o biochimica nel senso antico della parola.

## ZUSAMMENFASSUNG

Unter Benützung einiger der früher isolierten Alkali-ertragenden Stamme hat Verf. weitere Untersuchungen über die Degradation der Rebstockschösslinge unternommen. Die erzielten Ergebnisse sind befriedigend gewesen, sei es bezüglich des von den Rebstockschösslingen erreichten Degradationsgrades, sei es in Bezug auf die Möglichkeit in grossen Industriebetrieben reichliche Mengen Ausschusslauge zu verwerten, die gegenwärtig unbenützt bleiben.

Gute Resultate sind auch mit anderen Pflazen erhalten worden (*Ampelodesma mauritanica* Dur und Schinz, und *Spartium junceum* L.) die sich infolge der Gegenwart von Kieselerde, oder wegen anderen Ursachen, bis jetzt einer mikrobiologischen oder biochemischen Röstung -im alten Sinne des Wortes nicht eigneten.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) S. Riccardo. - L'azione di microbi alcali-tolleranti nella preparazione di paste cellulosiche (Esperienze con tralci di vite ridotti a trucioli). «Annali della Facoltà di Agraria della R. Università di Napoli», Serie III, vol. X, 1939, pp. 249-258 (con 4 tavole).
- (2) G. Bredemann. - Untersuchungen über den Fasergehalt verschiedener Pflanzen. «Faserforschung», Leipzig, Band 14, Heft 2, 1939, pagine 105-112.
- (3) F. G. Palazzo. - Cellulose greggie e nobili di materie prime nazionali. Firenze, Tip. Mariano Ricci, 1935, p. 75 e sg.
- (4) A. Trotter. - Piante tessili: Le Ginestre. «L'Italia Agricola», anno 73, n. 3, 1936.
- (5) G. Rovesti. - La ginestra e le sue utilizzazioni. Prodotti e sottoprodotti. (Pubblicazioni della Confederazione Fascista degli Industriali). Usila, Roma, 1940, p. 61.

- (6) C. Antoniani. - Aspetti tecnologici della industria della ginestra. «L'Italia Agricola», Roma, n. 7, luglio 1940, pp. 499-501.
- (7) L. R. Jones. - The cytolytic enzyme produced by *Bacillus carotovorus*, ecc. «Centr. für Bakt.», II abt., Bd. XIV, p. 257.
- (8) D. Carbone. - La macerazione industriale delle piante tessili col *Bacillus felsineus*. II ediz., I.S.M., Milano, 1926.
- (9) D. Carbone. - La macerazione microbiologica delle piante tessili. «Atti del VI Congresso Nazionale di Microbiologia», Milano, 1937, pagine 699-719.
- (10) F. Ehrlich. - Ueber die Pektolase, ein neu aufgefundenes Pektineu-ferment. «Biochem. Zeitschr.», vol. 250, 1932, p. 525; II, Ibidem. vol. 251, 1932, p. 204.
- (11) Ehrlich, Guttmann e Haensel. - «Ueber Pektin-ferment III. Mitt.», Ibidem, vol. 281, 1935, p. 93.
- (12) A. Waksman and T. C. Cordon. - A method for studying decomposition of isolated lignin, and the influence of lignin on cellulose decomposition. «Soil Science», vol. 45, 1938, pp. 199-201.
- (13) I. Lipska. - Les bactéries alcalinisantes du groupe «coli-aérogènes» du lait. «Le Lait», Paris, n. 147, 1935, pp. 705-710.
- (14) M. V. Mossevich. - Study on alkali resistant microorganisms. «Microbiologia» (Rivista russa di Microbiologia generale, agraria e industriale), Mosca, vol. IV, parte II, 1935, pp. 240-246.
- (15) E. Kayser e H. Delaval. - «Bull. Soc. d'Encourag. de l'Ind. nation.», vol. 132, 1920, p. 277.
- (16) H. J. Conn, G. E. Wolfe e M. Ford. - Taxonomic relationship of «Alcaligenes» sp. to certain soil saprophytes and plant parasites. «Journ. Bact.», vol. 39, n. 2, febbraio 1940, pp. 207-226.
- (17) A. C. Thaysen and H. J. Bunker. - The Microbiology of Cellulose, Hemicelluloses, Pectin and Gums. Oxford University Press, 1927.
- (18) S. Riccardo e M. Bilardello. - Sulla decomposizione chimico-microbiologica dei tralci di vite (Contributo sperimentale). «Annali della Facoltà di Agraria della R. Università di Napoli», Serie III, vol. IX, 1938.
- (19) P. G. Caraglio. - Corso di Enologia. Ed. da «Il Progresso vinicolo», Firenze, 1938, p. 282 e s.
- (20) S. Sorgato e R. Valente. - Produzione di alcoli da sarinenti di vite. «La Chimica e l'Industria», settembre 1940, p. 413.
- (21) O. Rotini. - «L'Italia vinicola ed agraria», XXVII, 500, 1938.
- (22) E. Carino-Canina. - I tralci di vite quale materia prima per la produzione di furfurolo. «La Ricerca Scientifica», Roma. A. XI, n. 6, giugno 1940, p. 472.
- (23) F. C. Palazzo. - Fabbricazione industriale dell'alcool etilico da materiali legnosi. «Giornale di chimica industriale ed applicata», Milano, Anno XVI, 1934, p. 443.

(24) *M. Giordani*. - Alcool da materiali cellulosici. «La Chimica e l'Industria». Milano, A. XXI, maggio 1939, p. 265.

(25) *M. Sacchetti*. - Studi ed esperienze sulla macerazione della canapa. Editto dalla «Federcanapa». Roma, 1938.

(26) *K. Stormer*. - Ueber die Wasserröste des Flachses. «Centralbl. für Bakt», II Abt., Bd XIII, 1904.

(27) *G. Ruschmann*. - Grad und Bedeutung der Säurebildung in biologischen Rösten. «Faserforschung», Leipzig, 1 Heft, 1921.

(28) *G. Habermann*. - Der Säuregehalt des Rostflachses im nassen, Künstlich und natürlich getrockneten Zustande. «Faserforschung», Leipzig, 3 Heft, 1921.

---



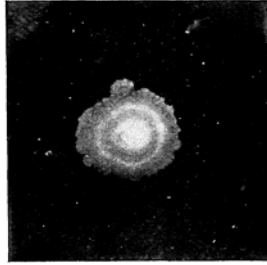


Fig. 1

*Fig. 1. - Colonia del microorganismo 1 su agar comune, alcalinizzato col 0,6% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , dopo 15 giorni a  $34^\circ\text{C}$ .*

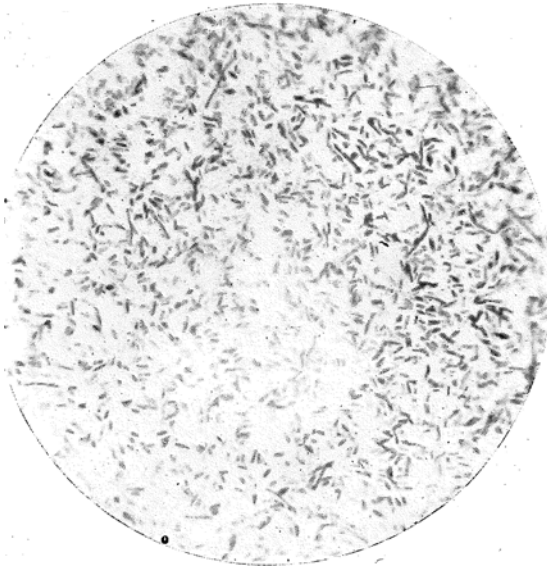


Fig. 2

*Fig. 2. - Lo stesso microorganismo, coltivato in brodo comune, con aggiunta dell'1% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Ingr. circa 700 diam.).*

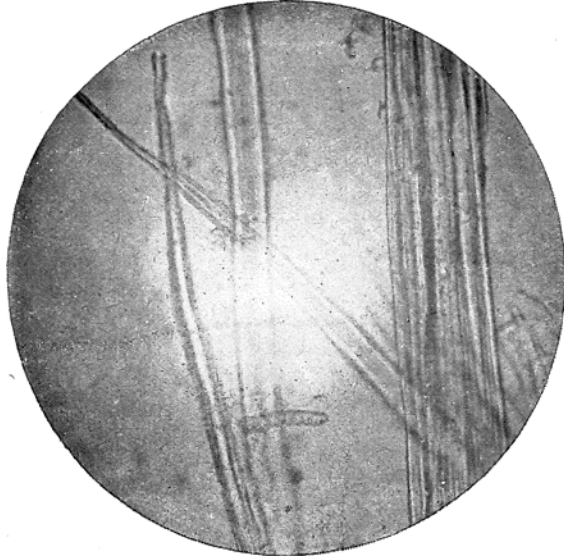


Fig. 3

*Fig. 3-4. - Stato di disgregazione raggiunto dai trucioli di tralci delle vasche VII e VIII, contenenti liscivia di «Effluente A» diluita 1:2, e insemata con miscela batterica. (Osserv. dopo 5 mesi a 30° C.; ingr. circa 120 diam.).*

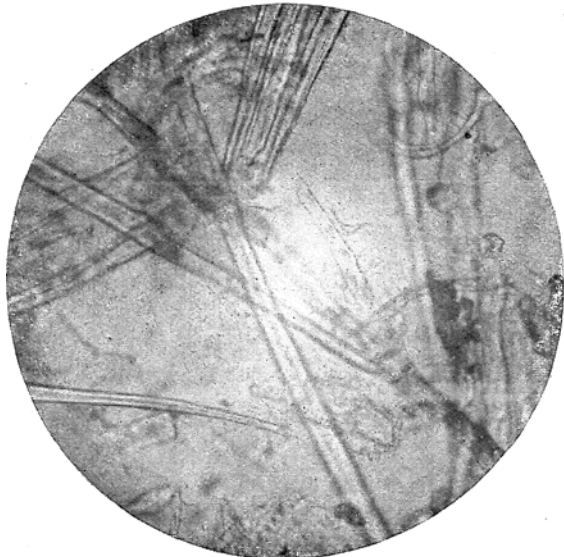


Fig. 4

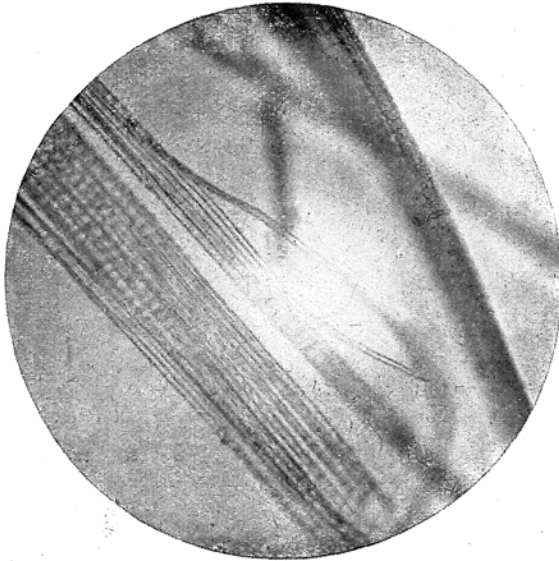


Fig. 5

*Fig. 5-6. - Stato di disgregazione raggiunto dal materiale dei provettoni contenenti soluz. al 0,5% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , e insemenzati con miscela batterica. (Osserv. dopo 5 mesi a  $30^\circ\text{C}$ .; ingr. circa 120 diam.).*

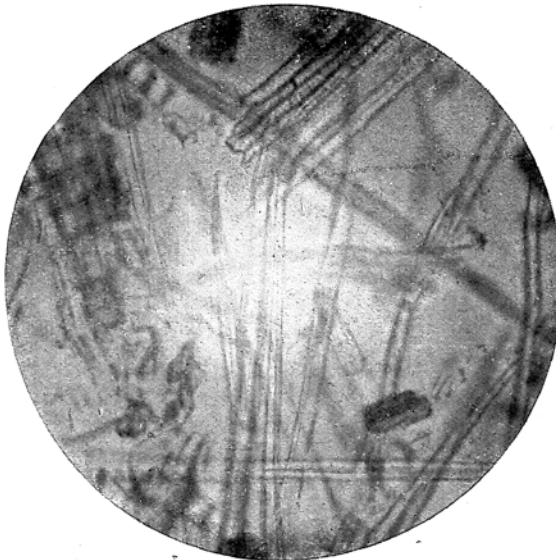


Fig. 6

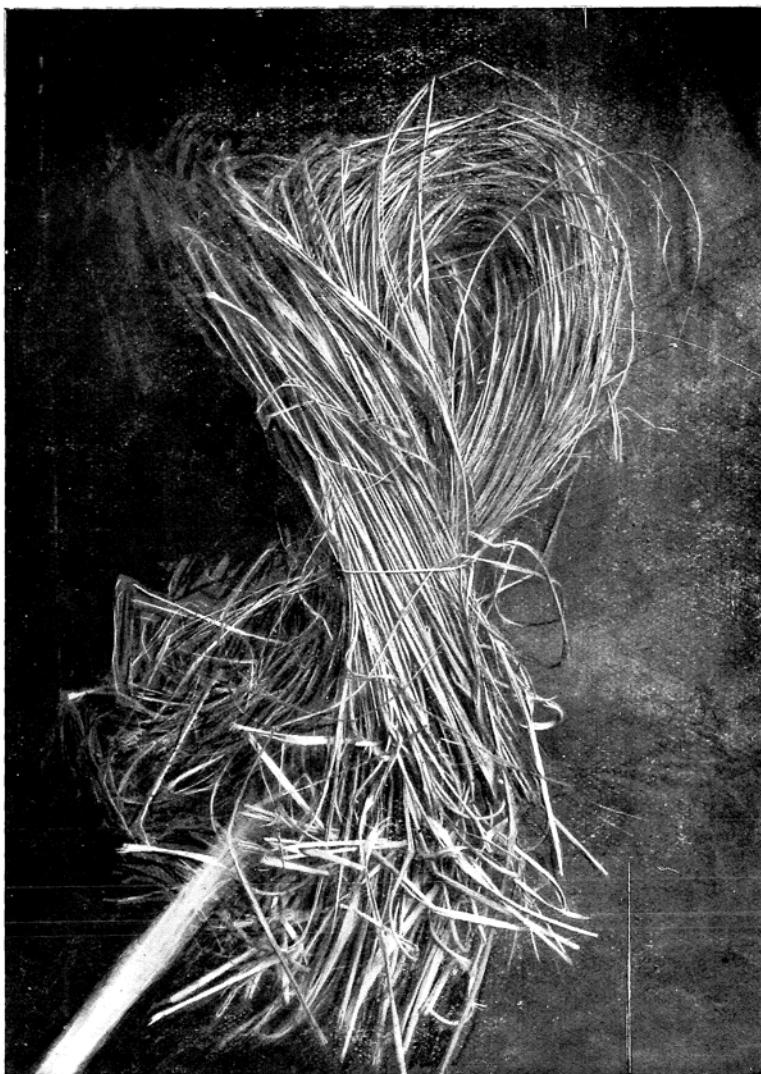


Fig. 7

*Fig. 7. - Foglie di Ampelodesma mauritanica Dur. et Schinz dopo un mese di permanenza a temperatura ambiente (15 C°) in soluz. acquosa al 0,7% di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e successivo lavaggio con acqua di condotta. Si noti lo stato pressocchè normale delle foglie.*

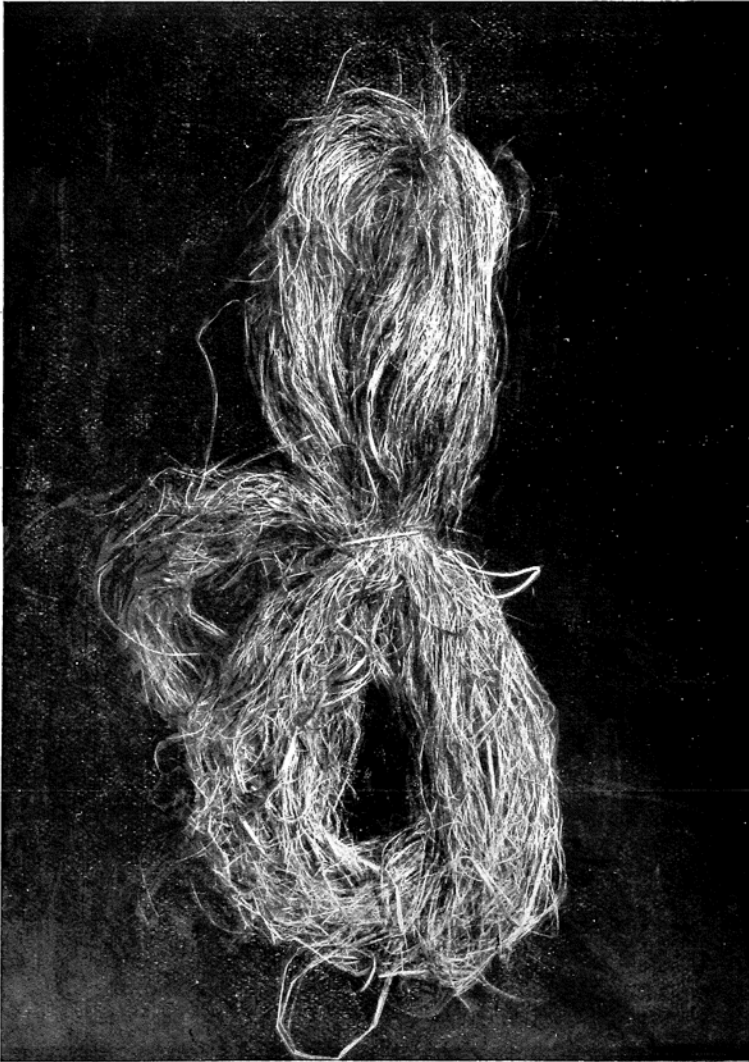


Fig. 8

*Fig. 8. - Grado di macerazione raggiunto dalle foglie di Ampelodesma mauritanica (previamente trattate come nella fig. 7) dopo due mesi in infuso di canapa alcalinizzato col 0,40% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e insemizzato con miscela batterica. Temperatura termostato: 30° C.*



Fig. 9

*Fig. 9. - Grado di macerazione raggiunto dalle foglie di Ampelodesma mauritanica (previamente trattate come nella fig. 7) dopo due mesi in infuso di canapa alcalinizzato col 0,6% di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e insemizzato con miscela batterica. Temperatura mostrata: 30° C.*

# 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 RISERVA LIT. 358.000.000

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

*L'apporto della SNIA VISCOSA al  
conseguimento dell'autarchia tessile:*

## **CELLULOSA NOBILE**

*La materia prima per la  
produzione delle fibre  
tessili artificiali.*



## **RAION E FIOCCO**

*I tessili artificiali  
preferiti dagli italiani.*



## **L A N I T A L**

*La nostra lana.*

---

# **SNIA VISCOSA**

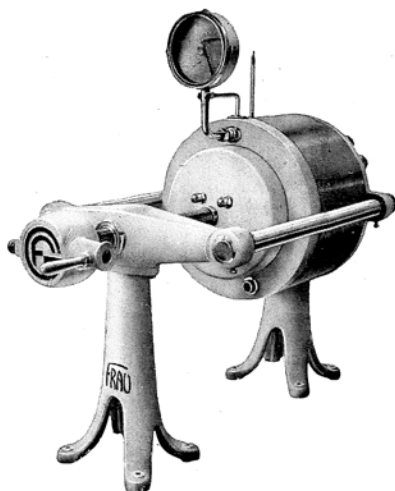
MILANO - VIA CERNAIA, 8 - MILANO



PASTORIZZATORE  
STRATIFICATORE  
RECUPERATORE  
REFRIGERANTE PER LATTE

F R A U

THIENE



COSTRUZIONE DI TUTTE LE MACCHINE PER  
L'INDUSTRIA ED IL TRATTAMENTO IGIENICO  
DEL LATTE

# 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-  
stiaime 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