

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

DICEMBRE 1941 - XX

VOL. II - FASC. I

ORGANO DELLA STAZIONE SPERIMENTALE
DI BATTERIOLOGIA AGRARIA DI CREMA

DIREZIONE ED AMMINISTRAZIONE: MILANO VIA CELORIA 2

NORME DI COLLABORAZIONE

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

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

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

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

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

Per la bibliografia si prega si attenersi alle seguenti norme:

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

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

Per i numeri decimali adoperare virgole e mai punti, così nel testo come nelle tabelle.
Adoperare sempre le seguenti abbreviazioni:

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

(tutti questi segni sempre senza punto)

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

SOMMARIO

| | | |
|--|------|----|
| | pag. | 1 |
| M. MAZZEO - G. MARINELLI - Ancora sull'autodepurazione degli ortaggi | | |
| O. VERONA - Influenza di alcuni elementi oligodinamici sopra il processo di nitrificazione | » | 4 |
| T. CASTELLI - Temperatura e chimismo dei blastomiceti | » | 8 |
| I. POLITI - Sull'intervento microbico nei processi di mobilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del terreno agrario | » | 23 |
| I. POLITI - Ricerche sui fermenti lattici (Nota III) | » | 31 |

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

Ancora sull'autodepurazione degli ortaggi

(Ricevuto il 16 ottobre 1941 XIX)

In un recente fascicolo dell'«Archivio Botanico» (vol. XVII, terza serie, vol. I, fasc. I, 1941), il prof. E. Baldacci si è occupato di due nostri lavori sull'autodepurazione degli ortaggi assoggettandoli ad una cortese ma – almeno nelle intenzioni – stringata critica; per concludere che non era d'accordo con noi circa la esistenza di un fenomeno di autodepurazione e circa la importanza che in esso avrebbe la reazione del succo delle piante.

Abbiamo accolto, come è consuetudine di ogni sperimentatore coscienzioso, con piacere e con interesse le osservazioni rivolteci; e le abbiamo valutate con grande attenzione, dovendo infine concludere che, a meno che il Baldacci non abbia frainteso le premesse, i risultati e le conclusioni dei nostri lavori – pure formulati, a nostro avviso, con sufficiente chiarezza – non ci pare che dette osservazioni siano fondate.

Ci rincresce di non poter qui trascrivere con la larghezza che sarebbe necessaria ad un efficace confronto fra le affermazioni nostre e quelle di Baldacci le parti più salienti dei lavori incriminati, uno dei quali contenente una rassegna bibliografica discretamente ampia; ci sforzeremo tuttavia di prospettare nel miglior modo possibile la questione, pregando coloro che avessero un particolare interesse a vedervi chiaro di leggere per esteso le nostre note.

Il Baldacci afferma che i batteri, compresi quasi tutti i fitopatogeni, non sono capaci di penetrare nell'interno delle cellule; e che resta quindi escluso che il succo delle cellule integre possa danneggiarli, quando essi contaminano le piante.

Noi non abbiamo affatto affermato il contrario; ed anzi abbiamo riportato numerose citazioni di autori che si sono occupati di tale argomento, con ogni obiettività e senza pronunziarci in merito, visto che – a quel che pare – neanche i botanici sono completamente d'accordo su questo punto.

Ma, continua Baldacci, i batteri possono entrare da lacerazioni di tessuti in cui sia stato messo in libertà succo cellulare; se però i tessuti sono stati lacerati prima dell'inquinamento batterico i succhi nel frattempo possono essere stati assorbiti o dilavati e la ferita cicatrizzata; ed anche in questo caso i germi che verrebbero a contatto con i famosi succhi. Verità lapalissiana, che non ci sogniamo di contrastare; pur dovendo far notare che ci pare alquanto ottimistica la speranza che i germi aspettino che la porta sia chiusa per potervi bussare; mentre sulla superficie delle piante stesse, nel suolo e sull'agente che ha prodotto la lesione essi potranno essere presenti con estrema facilità ed abbondanza.

Invece Baldacci è ottimista, perchè prosegue: « Resta il caso in cui i

batteri penetrino contemporaneamente alla lacerazione dei tessuti. Ma quante occasioni vi sono o vi possono essere perchè ciò avvenga? ». Lasciamo ai lettori di giudicare sul numero probabile di tali occasioni.

Comunque, che cosa succederà in questi casi? Baldacci afferma che allora si verificherà quello che è risultato dalle osservazioni sperimentali di Korinek, alle quali – secondo lui – abbiamo il torto di non aver dato giusto valore. E cioè « i germi si diffonderebbero nelle cavità intercellulari con l'acqua, e, quando questa è riassorbita dalle cellule, essi resterebbero aderenti alle pareti cellulari, in uno stato di vita latente. È probabile che essi vivano per un certo tempo a spese delle sostanze provenienti dalle cellule ferite, per quanto è loro possibile. La morte non avviene per azione dei succhi cellulari, ma al contrario per disseccamento o per impossibilità di nutrizione ».

Ed ora i lettori comprenderanno perchè, pur avendo noi citato – ed ampiamente – il Korinek, non abbiamo creduto opportuno soffermarci ad esaminare particolarmente le sue vedute e tanto meno a dare ad esse valore assiomatico. Che i batteri possano morire di inedia e di disseccamento nel bel mezzo di un tessuto vegetale vivente è cosa che riuscirà certo assai strana ai batteriologi; i quali conoscono la grandissima resistenza di tante specie batteriche, anche patogene, nell'ambiente esterno; e che anche recentemente hanno escogitato metodi per conservare quasi indefinitivamente ceppi batterici sottoponendoli proprio all'essiccazione. È assolutamente escluso che questa possa verificarsi nella compagine del vegetale; ma, se anche per un caso straordinario questo potesse succedere, ciò non impedirebbe ai germi, al riparo dalla luce solare, di rimanere vivi e vitali per molti mesi. Quanto alla inanizione, è superfluo far notare che i germi, i quali non hanno bisogno di energia calorifica e che non esplicano quasi altro lavoro se non quello (del resto intensissimo) della riproduzione, in mancanza di alimento – ed è tanto facile ad essi procurarselo in quella esiguità e semplicità che ad essi occorre – non potranno moltiplicarsi, ma non correranno davvero il rischio di morire di fame.

Però Baldacci ammette senz'altro per certa la affermazione di Korinek, che i germi in seno ai vegetali muoiono per mancanza di nutrimento e di acqua; pur concedendo « ma se con le ferite si introdurranno dei batteri molto sensibili alla concentrazione idrogenionica dei succhi, come è il caso di alcune specie saggiate da Mazzeo e Marinelli, si avrà una ragione di più perchè avvenga la morte dei bacilli, ma senza che in ciò sia da vedere una reazione della pianta; e perciò non mi sembra felice parlare di autodepurazione da parte delle piante ».

Noi abbiamo speso parecchie pagine dei nostri lavori per fare il punto circa la questione delle reazioni immunologiche delle piante, riferendo obiettivamente i lavori favorevoli e quelli contrari; e concludendo, prudentemente, che nulla di definitivo pare finora detto in proposito. E, come è fin troppo chiaro, non abbiamo affrontato sperimentalmente detta questione, bensì l'altra riguardante fenomeni puramente chimici, e cioè l'influenza della reazione dei succhi sulla vitalità dei germi penetrati nelle piante. Ci dispiace che il Baldacci non consideri l'azione della acidità dei succhi come un feno-

meno di autodepurazione; ma che cosa ci possiamo fare? Anche la luce solare ed altri fattori fisici e chimici vengono universalmente annoverati come elementi di autodepurazione dell'ambiente, senza che essi abbiano il minimo rapporto con le reazioni immunitarie!

Quanto alle critiche mosse da Baldacci ad un terzo lavoro pubblicato da uno di noi in collaborazione con altro sperimentatore – e che aveva fornito lo spunto agli altri due – ; e cioè quello sulla possibilità di penetrazione dei microrganismi nelle verdure, esso era soltanto una nota preliminare basata su esperimenti condotti in condizioni ben differenti da quelle che sogliono verificarsi in natura, come è facile rilevare al primo colpo d'occhio; e rappresentava soltanto un punto di partenza per altri esperimenti; punto, del resto, dal quale sono partiti quasi tutti gli autori che hanno voluto approfondire il problema. Se altri esperimenti che erano in programma non sono finora seguiti, è perchè nel frattempo l'altro collaboratore è stato nominato titolare ad una cattedra di Igiene lontano.

Le conclusioni del Baldacci sono che, fermi restando gli esiti delle nostre ricerche sull'azione dannosa degli acidi organici vegetali sui germi patogeni per l'uomo, egli non condivide la opinione che questi acidi agiscano nella pianta viva come fattori di autodepurazione per la difficoltà che essi hanno di venire e mantenersi a contatto con i batteri. È una opinione apprezzabilissima, che però non è in accordo con quella della totalità degli sperimentatori, a partire da quella di Korinek, che noi avremmo maltrattato e che ammette che i germi possano penetrare nella compagine di una pianta lesa. Non deve però Baldacci dire che la nostra spiegazione dell'azione dei succhi vegetali si ricollega idealmente a quella già propugnata dai vari fitopatologi, secondo i quali l'acidità dei succhi costituisce un'arma di difesa delle piante nelle malattie parassitarie, ipotesi che si è dimostrata infondata.

Noi crediamo benissimo che detta ipotesi non abbia potuto reggere agli esperimenti ed alla critica: è ovvio che germi fitopatogeni debbano essere insensibili almeno alla reazione naturale dell'ambiente in cui sono chiamati a svolgere la loro opera di danneggiamento, se no che fitopatogeni sarebbero? Ma i batteri patogeni per l'uomo non hanno il dovere di possedere questa resistenza; ed anzi è noto che sono abituati ad agire in ambiente alcalino e lo esigono anche per la coltivazione artificiale. Come si può istituire un confronto fra le armi difensive ed offensive di germi che devono esplicare attività biologiche tanto diverse?

Perciò, poichè Baldacci non nega quello che a noi premeva di dimostrare, e cioè che i succhi acidi delle piante esercitano influenza sfavorevole sulla vitalità dei germi patogeni per l'uomo (cosa d'altronde facilissima a controllare); ma si limita a negare che in pratica tale contatto fra questi germi ed i succhi possa avvenire, il che trasporta la questione in un campo puramente ipotetico, non potendo lo stesso Baldacci negare la possibilità del fatto; e poichè le discussioni su questo punto potrebbero continuarsi all'infinito, noi lo ringraziamo di aver voluto portare la sua attenzione sui nostri modesti lavori; ma dichiariamo che non ci sentiamo, in base a quanto egli ha prospettato, di modificare minimamente la nostra opinione e tanto meno l'interpretazione dei nostri risultati.

Influenza di alcuni elementi oligodinamici sopra il processo di nitrificazione

Prof. Onorato Verona

(Ricevuto il 17 ottobre 1941-XIX)

Più volte, in questi ultimi tempi, è stata richiamata l'attenzione degli sperimentatori sopra l'azione catalitica esercitata da alcuni elementi e, in particolare, dal molibdeno (1) — specie se in presenza di ferro (2) — sopra la fissazione biologica dell'azoto.

L'azione del molibdeno sembrerebbe notevolmente superiore a quella esercitata da tutti gli altri elementi cosiddetti oligodinamici sì da attribuire all'assenza dell'elemento nel terreno il carattere di fattore limitante dello sviluppo degli azotobatteri (3).

Attese queste osservazioni è sembrato di un qualche interesse indagare se il molibdeno eserciti pari azione catalitica sopra il processo di nitrificazione o, comunque, osservare se e fino a qual punto la presenza di variabili quantità di tale elemento influisca sul processo stesso.

In pari tempo è stata estesa la ricerca ad altri elementi (tungsteno, vanadio, wolframio, litio) incluso il boro — di cui anche molto si discute — e sulla influenza del quale è già stato preliminarmente riferito (4).

Le esperienze si inquadrano, adunque, in quelle già numerose, relative alle diverse influenze esercitate dagli elementi oligodinamici sul processo di nitrificazione.

* * *

Il metodo seguito è stato quello delle soluzioni. In Erlenmeyer, cioè, della capacità di 100 cc. sono stati versati cc. 50 di liquido nitrificabile costituito da acqua 1000, fosfato bipotassico 2, solfato ammonico 2, in presenza di gr. 1 per beutina di carbonato di magnesio. Aggiunte le quantità fissate dei composti degli elementi in esame, previa sterilizzazione, le beutine furono inoculate con gr. 1 di terra ed incubate a 25° C. per 25 giorni determinando quindi i nitrati formati. Tutte le prove furono eseguite in triplo.

Per la ricerca della nitrificazione del borato e del molibdato ammonico è stata adottata la stessa tecnica, sostituendo però questi composti al solfato ammonico e sterilizzando le beutine, anzichè in autoclave, a 60° C., due ore per giorno e per tre giorni consecutivi.

1) *Influenza del molibdeno e nitrificazione del molibdato ammonico.*

Il molibdeno è stato aggiunto, ai liquidi nitrificabili, sotto forma di acido fosfomolibdico nelle quantità comprese tra lo 0,5 e il 10 %.

Fu ottenuto:

| | | Gr. di HNO ₃ per litro di soluzione nitrificabile in presenza di ac. fosfomolibdico ‰ | | | | |
|---|--|---|-------|-------|-------|-------|
| | | 0,5 | 1 | 2,5 | 5 | 10 |
| controllo | | 0,200 | 0,450 | 0,275 | 0,250 | 0,200 |
| | | Gr. di HNO ₃ per litro di soluz. nitrificabile | | | | |
| Gr. ‰ di molibdato ammonico presente nel liquido di coltura, assente solfato ammonico | | 0,50 | | 0,150 | | |
| | | 0,75 | | 0,220 | | |
| | | 1 | | 0,300 | | |
| | | 2,50 | | 0,250 | | |
| | | 5 | | 0,250 | | |
| | | 10 | | 0,250 | | |

I risultati indicano che la presenza di piccole quantità di acido fosfomolibdico favoriscono il processo di nitrificazione e che quantità relativamente forti non lo deprimono. D'altra parte, il molibdato ammonico, risulta egregiamente nitrificato; e, fino alla quantità dell'1 ‰ viene nitrificato completamente.

2) *Influenza dell'acido borico e del borace e nitrificazione del borato ammonico.*

È stato sperimentato, oltre all'acido borico, anche il borace, inoculando una serie di beutine con terreno ad elevata attività nitrificante ed un'altra serie con terreno debolmente nitrificante.

Risultò:

| | | Gr. di HNO ₃ per litro di soluzione nitrificabile in presenza di ac. borico ‰ | | | | |
|-----------------------|--------|---|--------|--------|--------|--------|
| | | 0,05 | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 |
| 1 ^a serie: | 0,3000 | 0,3000 | 0,3000 | 0,4000 | 0,0100 | 0,0050 |
| 2 ^a serie: | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0020 |

Gr. di HNO₃ per litro di soluzione nitrificabile
in presenza di borace ‰

| | | 0,05 | 0,1 | 0,5 | 1 | 5 |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 ^a serie: | 0,3000 | 0,5000 | 0,4000 | 0,3000 | 0,2000 | 0,0050 |
| 2 ^a serie: | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0025 | 0,0020 |

| | | Gr. di HNO ₃ per litro di soluz. nitrificabile | |
|--|------|---|-------|
| Gr. ‰ di borato ammonico presente nel liquido di coltura, assente solfato ammonico | 0,10 | | 0,020 |
| | 0,50 | | 0,044 |
| | 1 | | 0,044 |
| | 2 | | 0,005 |
| | 5 | | |

Risultò che piccole quantità di acido borico e, soprattutto, di borace stimolano il processo di nitrificazione; però quantità superiori allo 0,5 ‰ lo deprimono.

Il borato ammonico nitrifica se presente in quantità non superiori all'1‰. In ogni caso è soltanto per quantità dello 0,1‰ che si ha formazione di acido nitrico quasi pari al teorico.

3) *Influenza del tungstato e vanadato sodico, dell'acido fosfowolframico e del cloruro di litio.*

Gr. di HNO_3 per litro di soluzione nitrificabile
controllo = 0,180

| | | | | | | | |
|----------------------------------|---|------|-------|-------------------------------|---|------|-------|
| ‰ di tungstato di sodio | } | 0,50 | 0,200 | ‰ di acido fosfowolframico | } | 0,50 | 0,200 |
| | | 0,75 | 0,200 | | | 0,75 | 0,190 |
| | | 1 | 0,200 | | | 1 | 0,200 |
| | | 2,50 | 0,200 | | | 2,50 | 0,200 |
| | | 5 | 0,260 | | | 5 | 0,180 |
| | | 10 | 0,170 | | | 10 | 0,200 |
| ‰ di vanadato di sodio (1) | } | 0,50 | + | ‰ di cloruro di litio | } | 0,50 | 0,190 |
| | | 0,75 | + | | | 0,75 | 0,200 |
| | | 1 | + | | | 1 | 0,200 |
| | | 2,50 | + | | | 2,50 | 0,180 |
| | | 5 | + | | | 5 | 0,150 |
| | | 10 | + | | | 10 | 0,080 |

(1) La presenza di nitrati fu controllata soltanto qualitativamente in quanto il metodo di dosaggio seguito (Grandval-Layoux) non consente di determinare i nitrati in presenza di vanadato di sodio.

Secondo quanto indicano i reperti sembrerebbe che il tungstato di sodio, l'acido fosfowolframico e, forse, anche il vanadato di sodio non esplicino sensibile influenza sul processo di nitrificazione, limitatamente, almeno, alle quantità aggiunte. Per quanto si riferisce al cloruro di litio è a rilevarsi che mentre piccole quantità non esercitano azione stimolante, quantità superiori al 5‰ tendono a deprimerlo.

Si può pertanto concludere:

1) l'acido fosfomolibdico stimola, per piccole dosi, il processo di nitrificazione e non lo deprime per dosi relativamente forti;

2) il molibdato ammonico viene nitrificato attenendosi, per quantità pari all'1‰, rendimenti pressochè uguali al teorico;

3) piccole quantità di acido borico e, soprattutto, di borace, stimolano il processo di nitrificazione; una quantità superiore allo 0,5‰ lo deprime;

4) il borato ammonico nitrifica se presente in quantità non superiori all'1‰;

5) tungstato sodico, acido fosfowolframico e, forse, anche vanadato sodico sembra che non esplicino particolare influenza sulla nitrificazione;

6) il cloruro di litio, presente in quantità superiore al 5‰ tende a deprimere l'attività nitrificante.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Bortels H.* - Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. « Arch. f. Mikr. », 1, 333, 1930.

— Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und anderen Erdschenstoffen für Stickstoffbindende und andere Mikroorganismen. « Centr. f. Bakt », II, 95, 193, 1936.

— Ergänzende Mitteilung über die Wirkung von Molybdän - Düngungen auf Luzerne im Feldversuch. « Centr. f. Bkt. », V, 103, 129, 1941.

(2) *Krzemieniewski S. e Kovats J.* - Ueber den Einfluss von Eisen und Molybdän auf die Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum*. « Bull. Ac. Polon. Sci. et Lett. », B, 169, 1937.

(3) *van Niel C. B.* - A note on apparent absence of *Azotobacter* in soils. « Arch. f. Mikr. », 6, 215, 1935.

Verona O. - À propos de l'influence du bore sur le processus de nitrification. « Boll. Sez. It. Soc. Int. Microb. », 1937.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird berichtet über den Einfluss, den einige Verbindungen von Molybdän, Tungsten, Vanadium, Wolfram, Bor und Lithium auf den Prozess der Salpeterbildung ausüben. Es wird ebenfalls über die Nitrifikation vom Ammoniumsalz der Borsäure und der Molybdänsäure berichtet.

Eine günstige Einwirkung ist für das Molybdän und kleine Quantitäten von Borsäure und Borax festgestellt worden. Es hat sich gezeigt, dass die Verbindungen von Tungsten, Wolfram und Vanadium keinerlei Wirkung ausüben, während die Wirkung des Lithiumchlorids eine verminderte Tendenz aufweist.

Ammoniumsalze aus Molybdänsäure und Borsäure werden, das erstere mehr als das letztere, in Salpetersäure umgewandelt.

SUMMARY

The influence brought into play by the presence of some compounds of molybdenum, tungsten, vanadium, wolframite, boron and lithium, during the process of nitrification is herein discussed. An account is also given of the nitrification of molybdate and of ammonium borate.

Favourable activity has been ascertained by the use of molybdenum and small quantities of boric acid and of borax. The trials made with compounds of tungsten, wolframite and vanadium shows that no action whatever is exercised by these compounds, while a tendency to depression was manifest by the action of chloride of lithium.

Molybdate and ammonium borate both undergo nitrification; the former more fully than the latter.

Temperatura e chimismo dei blastomiceti

Prof. Tommaso Castelli (Dir. Inc.)

(Ricevuto il 17 ottobre 1941-XIX)

In una nota precedente ho riferito (1) una serie di analisi chimiche condotte su liquidi completamente fermentati ottenuti seminando un medesimo mosto di uva bianca con numerosi stipti blastomicetici isolati dai materiali più vari. Detta nota ha rappresentato soltanto una ricerca di orientamento per indagini successive da condursi esclusivamente su forme isolate da mosti in fermentazione. Tutti riconoscono ormai l'efficacia dell'uso di culture pure da usare alla vendemmia per la preparazione di mesti-lieviti onde ottenere un regolare andamento della fermentazione. L'industria produce e smercia, forse non troppo largamente, questi materiali che vengono indicati col nome di fermenti selezionati. Non è certamente di questa sede lo scopo di fare una critica dei singoli prodotti che si trovano in commercio; è però opportuno ricordare che a detti preparati commerciali vengono attribuiti anche degli effetti miracolosi che non sono sufficientemente suffragati dalla ricerca scientifica. Così ad esempio nessuno più crede alle decantate caratteristiche di alcuni lieviti, isolati da uve o vini famosi, capaci di far ottenere un dato tipo di vino qualunque fosse stato il mosto dal quale si era partiti. Ma tralasciando questa questione sulla quale sia uomini di valore, anche recentemente (2), come la pratica hanno dimostrato la completa infondatezza, si parla tutt'ora di lieviti da usarsi per la vinificazione di uve bianche o di uve rosse, di culture da adoperarsi in singole regioni o di materiali che riuscirebbero a fornire ottimi risultati in qualsiasi zona e per qualunque mosto. È ovvio riconoscere che dette indagini si presentano tutt'altro che semplici anche perchè esse si possono considerare rispondenti soltanto se eseguite su un numero abbastanza rilevante di culture. Con questo intendimento in laboratorio sono state isolate culture di blastomiceti in numero veramente imponente (oltre 1000) nelle ricerche eseguite sugli agenti della fermentazione vinaria nell'Umbria (3), nel Chianti classico e zone limitrofe (4) (5) e nei colli romani (6). Di queste culture ne sono state mantenute alcune che in saggi preliminari hanno dimostrato di possedere certe caratteristiche e su di esse verranno condotte diverse indagini.

Nella presente nota vengono riferiti i risultati di alcune analisi chimiche eseguite su liquidi provenienti da uno stesso mosto ma seminato con 20 diverse culture di blastomiceti e mantenuti a temperature differenti. Prima di esporre i risultati ottenuti e le deduzioni che da essi si possono trarre ritengo necessario passare in rapida sintesi quanto è stato scritto in proposito specialmente da autori italiani.

La ricerca di eventuali specie o razze di lieviti capaci di fermentare

bene a determinate temperature interessa moltissimo la pratica enologia specialmente in una nazione come la nostra ove il vino viene prodotto in tutte le regioni che presentano temperature ben differenti al momento della vendemmia. Chiunque abbia conoscenze, sia pure in elementi, di enologia o meglio posseda cognizioni pratiche in proposito sa bene a quali accorgimenti necessita ricorrere specialmente per difendersi dall'elevata temperatura nel meridione, e come le cantine del settentrione debbono essere fornite di caloriferi perchè spesso, in dette regioni, la temperatura durante la vendemmia è talmente bassa che il mosto stenta ad iniziare la fermentazione e questa procede lentamente.

Si ritiene oggi che l'ottimo di temperatura dell'ambiente dove avviene la fermentazione tumultuosa debba essere intorno a 18°.

Vecchie ricerche di Ravizza (7) hanno dimostrato che sia l'elevata concentrazione del mosto come l'alta temperatura ostacolano la fermentazione. A temperature basse, intorno a 12°, la fermentazione può verificarsi in maniera completa però essa si prolunga per un periodo di tempo troppo forte. La temperatura migliore per mosti contenenti circa il 20 % di zucchero risulta, secondo Ravizza, essere quella di 25°. Fonseca (8) riferisce che è notevolmente svantaggioso vinificare, nei paesi caldi, ad elevate temperature. I vini che così si ottengono rimangono dolci, meno alcolici, contengono maggiori quantità di acido acetico e sono predisposti ad ammalarsi. Anche Müller Thurgau (9) operando a temperature di 9°, 18°, 25° e 36° riferisce che i migliori risultati si ottengono a 18°; a 9° si ha una maggiore produzione di alcol però la fermentazione si prolunga troppo.

Ricerche di Mensio (10) dimostrano chiaramente che la temperatura di 20° è quella che si deve considerare la più rispondente poichè in tal maniera si ha produzione di più alcol e l'acidità volatile è bassa. A temperatura di 27° e specialmente di 35° si ha un notevole abbassamento della quantità di alcol e un sensibile aumento dell'acidità volatile. A 10° la produzione di alcol e di acidi volatili non diversifica sensibilmente da quanto si ottiene a temperatura di 20° però la fermentazione si prolunga troppo. Si è notato che generalmente i vini ottenuti da mosti fermentati a temperature piuttosto basse presentano caratteri di finezza maggiori di quelli che si ottengono da fermentazioni normali. Si possono citare a questo scopo, tra le tante, le ricerche di Briganti-Rossi e Ulpiani (11) i quali presero anche un brevetto per un sistema di vinificazione a bassa temperatura. Riferiscono essi che facendo fermentare mosto di uva catalanese comparativamente a temperatura ritenuta normale e a temperatura compresa tra 2°-4°, il prodotto ottenuto dal secondo sistema era molto migliore perchè più delicato, con profumo di frutta, minore acidità ecc. Osterwalder (12) ha saggiato per una serie di lieviti la capacità a fermentare a temperatura bassa. Secondo detto autore l'indicata capacità è posseduta da pochissime specie le quali, con un lungo periodo di tempo possono produrre da un mosto col 12 % di zucchero anche il 6% di alcol. Kroemer e Krumbholz (13) adoperando un lievito - Winningen - hanno visto che a temperature oscillanti tra 11°-15° la fermentazione era completa in 38 giorni, tra 6°-10° si prolungava a 12-15 settimane mentre a temperatura di 3,5° anche dopo sei mesi la quantità di

alcol formata era molto scarsa. Porchet (14) ha svolto un interessante studio sulla biologia dei lieviti capaci di fermentare a bassa temperatura. È stato dimostrato che detta capacità è propria di alcune razze particolari di *Sacch. ellipsoideus* le quali mantengono questa caratteristica anche se vengono coltivate lungo tempo a 20°. La resistenza al freddo di queste razze non è quindi un adattamento passeggero. Praticamente si è visto che questi — frigolevures — sono capaci di fermentare a temperatura compresa tra 5° e 10° con rapidità molto maggiore dei lieviti comuni e pertanto essi possono utilmente essere impiegati per la fermentazione di mosti di frutta o di mosti d'uva nelle località o ambienti ove non è possibile riscaldare. Ricerche di Casale (15) hanno dimostrato che con lieviti resistenti al freddo è possibile ottenere buoni risultati nella preparazione di alcuni vini fini. Comparando i risultati ottenuti a temperatura di 20° e di 3° si osserva nel primo caso una fermentazione completa in 8 giorni e da 15 a 30 giorni nel secondo. I vini fermentati a bassa temperatura presentano un lieve maggior contenuto in alcol e una sensibile minore quantità di acidi volatili. Tarantola (16) ha fatto prove comparative usando lieviti resistenti al freddo, nella vinificazione del moscato di Asti, rispettivamente alle temperature di 16° e di 5°. Tra i due tipi di vino così ottenuti l'analisi non ha dimostrato sensibili differenze. Nette differenze invece sono apparse, e a vantaggio del vino ottenuto a fermentazione bassa, alla degustazione. I caratteri della spuma e la sua persistenza erano maggiori che per il vino ottenuto al 16°. Ma, osserva Tarantola, che questo maggiore grado di finezza non compensava certamente le maggiori spese sostenute per la refrigerazione. Riassumendo si può dedurre che è sufficientemente dimostrata l'esistenza di lieviti capaci di fermentare a temperature fortemente diverse e che pertanto la ricerca e l'individuazione di essi possa portare a reali vantaggi nella pratica enologica. Naturalmente la ricerca va eseguita entro limiti piuttosto ristretti di gradi di temperatura perchè l'impiego di impianti frigoriferi o calorifici eleva moltissimo, specie per la refrigerazione, il costo del prodotto e queste applicazioni potranno forse sussistere in casi e per prodotti del tutto particolari. Ma per la produzione normale del vino comune da pasto, perchè forse finora, soltanto per esso è dimostrato il reale utile impiego di culture pure, la ricerca di particolare culture saccaromicetiche capaci di fermentare a temperature comprese tra 10° e 25° riveste un'importanza pratica del tutto particolare.

* * *

Nelle presenti ricerche sono state usate 20 culture blastomicetiche isolate tutte da mosti d'uva in fermentazione meno lo stipite di *Schizosaccharomyces Pombe* che venne isolato dal laghi tripolino.

Le culture usate. sono state le seguenti:

- 8 stipiti di *Saccharomyces ellipsoideus*. Hansen;
- 1 stipite di *Saccharomyces ellipsoideus* var. *umbra*. Castelli;
- 1 stipite di *Saccharomyces ellipsoideus* var. *major*. Castelli;
- 1 stipite di *Saccharomyces uvarum*. Beijerinck;
- 1 stipite di *Saccharomyces Bayanus*. Will;
- 1 stipite di *Saccharomyces italicus*. Castelli;

- 2 stipiti di *Torulaspora Rosei*. Guilliermond;
- 1 stipite di *Schizosaccharomyces Pombe*. Lindner;
- 1 stipite di *Torulopsis pulcherrima*. (Lindner) Saccardo;
- 2 stipiti di *Pseudosaccharomyces apiculatus*. (Rees) Klöcker;
- 1 stipite di *Pseudosaccharomyces magnus*. De' Rossi.

Il mosto usato era di uva bianca e proveniva dalla regione umbra. Esso appena ottenuto dalla spremitura fu arricchito di una certa quantità di zucchero, venne riscaldato e passato attraverso una reticella metallica a maglie sottili. Tenendo costantemente agitata la massa onde potesse essere distribuito uniformemente, fu versato in vasetti cilindrici della capacità di circa 300 cc. in ragione di 250 cc. per ciascun vasetto. I vasetti vennero infine tappati con cotone greggio e sterilizzati per 40' alla pentola di Koch. All'analisi, il mosto, presentò una gradazione zuccherina del 25,75 % e 12,20 per mille di acidità espressa come acido tartarico.

Vennero complessivamente preparati 120 vasetti che furono dapprima riuniti in 20 gruppi di sei ciascuno ed ogni gruppo fu seminato colla medesima cultura. Per l'inseminamento mi sono valso di culture allestite su agar di malto di tre giorni a 25° portando in ogni vasetto un'ansata di patina microbica. Successivamente dei vasetti, opportunamente contrassegnati, furono fatti sei grandi gruppi di 20 ciascuno che furono posti rispettivamente alle seguenti temperature: 5.6 - 10.12 - 15.17 - 25 - 30 - 37°. Per gli ultimi tre gruppi le temperature erano ben definite poichè i vasetti vennero posti in termostati ben regolati, per gli altri tre gruppi i vasetti furono messi in diversi ambienti del laboratorio ove le temperature potevano oscillare entro due gradi.

L'entrata in fermentazione si verificò prontamente, cioè entro le 24 ore, per tutte le culture poste a 30° e 37°; per quelle messe a 25° la fermentazione si iniziò, per alcune culture, verso la trentesima ora e dopo 48 ore in tutti i vasetti si dimostrò evidente sviluppo di gas. Alle temperature comprese tra 15°-17°, la produzione di gas si iniziò, per alcune culture, dopo 48 ore e dopo 3 giorni tutti i vasetti erano in fermentazione. A 10°-12° invece soltanto dopo 5 giorni si iniziò, in alcuni vasetti, una leggera produzione di gas e dopo 10 giorni in tutte le culture era evidente una fermentazione più o meno forte. Alla temperatura compresa tra 5°-6° soltanto dopo 15 giorni si manifestò una fermentazione per le culture 6-31 e 377. Tutte le altre culture stentaron molto a porsi in fermentazione ed essa si presentò sempre molto stentata.

Le analisi chimiche sono state iniziate dopo 40 giorni ponendo in esame dapprima il contenuto dei vasetti posti a 37° e proseguite successivamente per le culture a 30 - 25 - 15.17- 10.12° e 5.6°; occorre però notare che dopo 40 giorni tutti i vasetti sono stati messi nell'ambiente ove la temperatura era di 5°-6°. Ho creduto opportuno agire in tale maniera anzichè aggiungere sostanze o eseguire trattamenti antisettici che forse avrebbero potuto influire modificando eventualmente i risultati analitici. In tal modo le culture poste a temperatura di 5°-6° hanno avuto un periodo d'incubazione maggiore di circa 12 giorni mentre tutte le altre sono state mantenute per periodi leg-

germente maggiori di 40 giorni, ma per questo spazio più o meno breve di tempo sono rimaste a 5°-6°.

Le analisi chimiche eseguite sono state le seguenti: ricerca del grado alcolico, determinazione dell'acidità totale e volatile, ricerca dell'acetoina; i procedimenti analitici messi in opera corrispondono esattamente a quelli da me indicati nella già citata nota ⁽¹⁾.

I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella ove in una prima colonna è riportato lo stipite con l'indicazione numerica della collezione, in una seconda la specie blastomicetica con l'indicazione della località e dell'anno d'isolamento, infine seguono i dati analitici per tutte le temperature saggiate. L'acetoina non è stata determinata quantitativamente; a questo proposito il segno - ne indica l'assenza mentre i vari segni + ne stanno a rappresentare quantità progressivamente maggiori.

Con i valori della tabella sono stati costruiti i singoli grafici i quali ci danno in maniera più facile ed immediata l'andamento dei risultati analitici. Nei grafici sono riportate in ascissa le temperature ed in ordinata i valori dell'alcol, come linea intera, e dell'acidità volatile, come linea tratteggiata, la presenza o meno dell'acetoina è stata indicata coi segni + e - posti in basso. Non si è creduto opportuno riportare i valori dell'acidità totale, mentre a rendere più dimostrativi i grafici medesimi, i valori dell'acidità volatile sono riportati come centuplicati. Pertanto, ad esempio, un valore in ordinata indicato come 10 sta a significare 10 % di alcol in volume ed un grammo per litro di acidità volatile.

* * *

Per potersi orientare sui dati analitici ottenuti ritengo necessario limitare dapprima l'esame della sola produzione di alcol negli stipiti di *Saccharomyces ellipsoideus* e in quelli da riportarsi a sue varietà.

Iniziando dalle basse temperature si osserva per le dette 10 culture che a 5°-6° non si è avuta, per nessun stipite, la massima produzione di alcol anzi essa si è mantenuta generalmente assai bassa e soltanto nello stipite 364 e maggiormente nella cultura 6 ha raggiunto valori ragguardevoli.

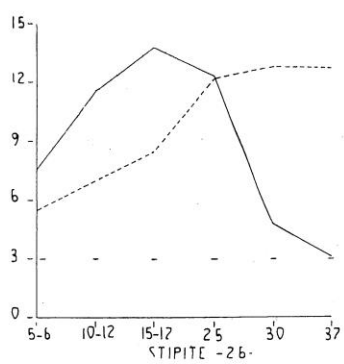
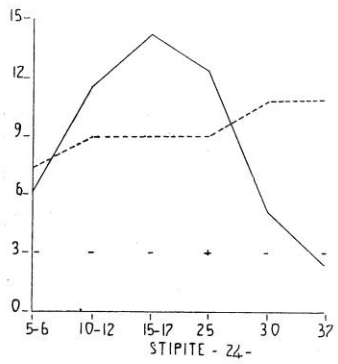
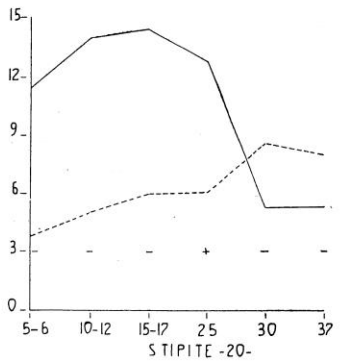
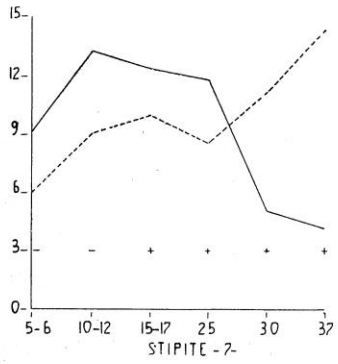
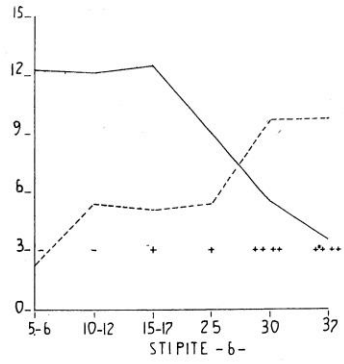
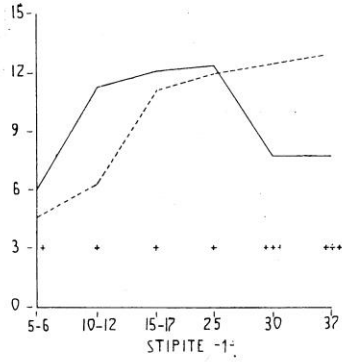
A temperature comprese tra 10°-12° la produzione di alcol è stata abbastanza notevole ma soltanto per le culture 7 e 31 essa è stata la massima riscontrata. Lo stipite 6 ha dimostrato di produrre quantità pressochè identiche di alcol alle temperature comprese tra 5°-6° e 15°-17°.

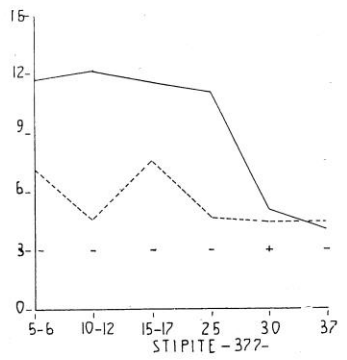
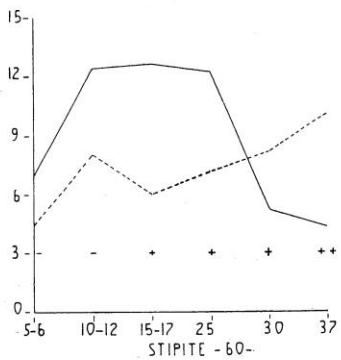
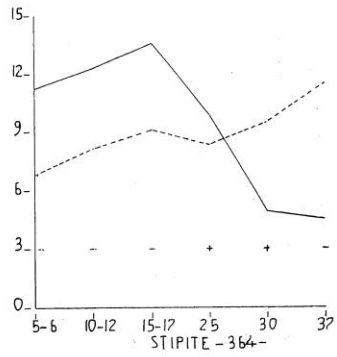
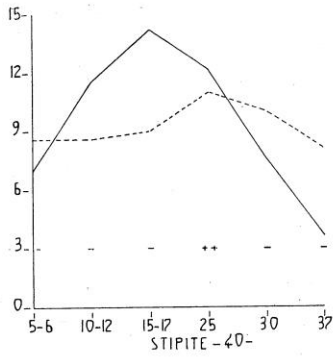
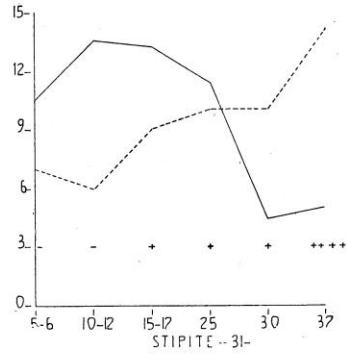
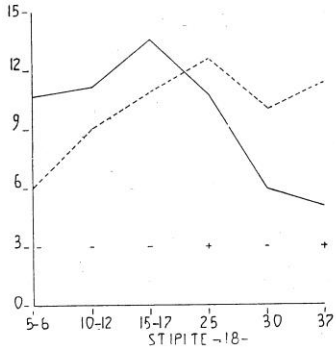
A 15°-17° si ha l'ottimo per la maggior parte delle culture; infatti su 10 di esse prese in considerazione ben sette hanno prodotto, a detta temperatura, le maggiori quantità di alcol.

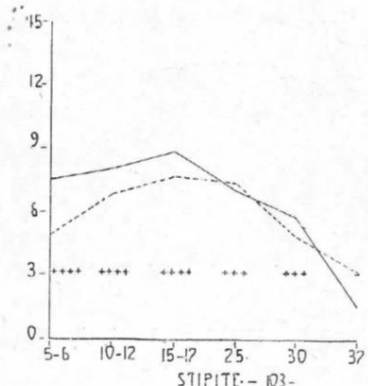
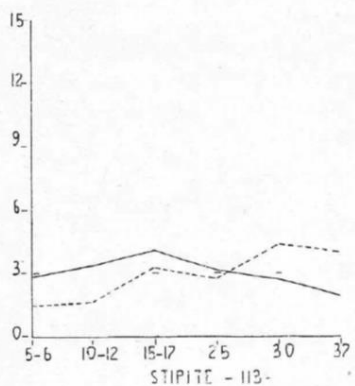
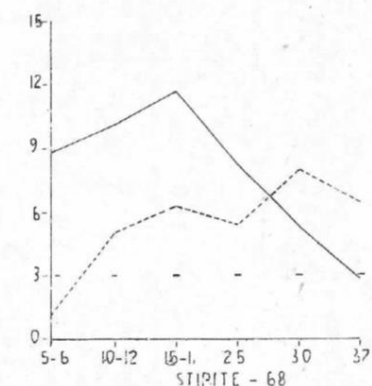
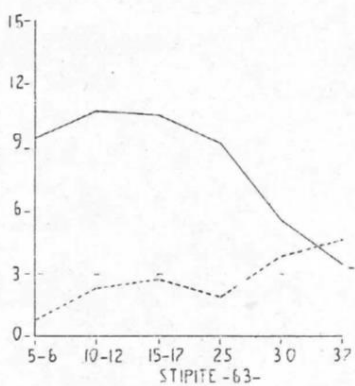
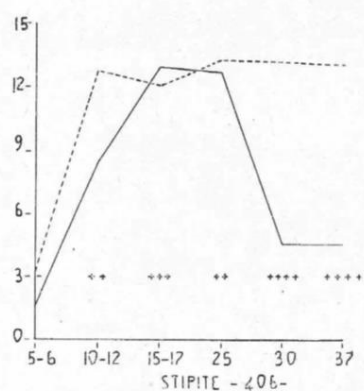
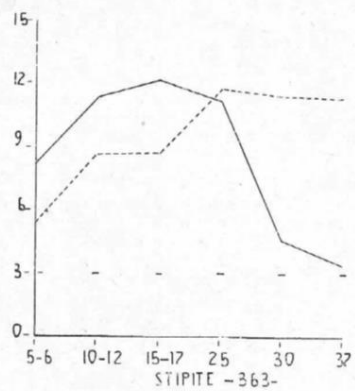
A temperatura di 25° soltanto lo stipite 1 ha dimostrato la massima capacità a produrre alcol, mentre tutti gli altri stipiti ne hanno prodotto meno e per alcune culture molto meno. Alla temperatura di 30° e maggiormente a quella di 37° la produzione alcolica appare molto limitata per tutti gli stipiti.

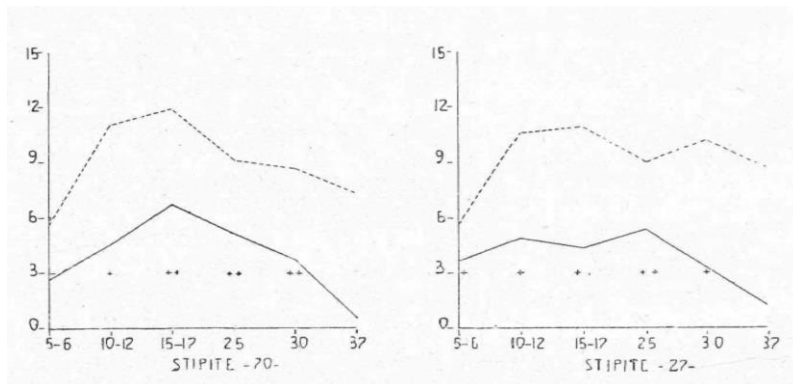
Per le altre specie da riportare al genere *Saccharomyces* si è visto che mentre per il *Sacch. Bayanus* la produzione alcolica è quasi identica per le temperature comprese tra 10°-12° e 25°, per *Sacch. uvarum* la temperatura più confacente si è dimostrata quella di 10°-12° e per *Sach. Italicus* di

| Specie calità e data 'isolamento | Temperatura 5°-6° | | | Temperatura 10°-12° | | | Temperatura 15°-17° | | | Temperatura 25° | | | Temperatura 30° | | | Temperatura 37° | | | | | |
|--|-------------------|----------|-------|---------------------|----------|-------|---------------------|----------|-------|-----------------|----------|--------|-----------------|----------|-------|-----------------|----------|-------|------|-----|----------|
| | Alcol. | Ac. vol. | Acet. | Alcol. | Ac. vol. | Acet. | Alcol. | Ac. vol. | Acet. | Alcol. | Ac. vol. | Acet. | Alcol. | Ac. vol. | Acet. | Alcol. | Ac. vol. | Acet. | | | |
| cb. ellipsoidea bria, 1912 | 6 | 10,35 | 0,46 | + | 11,26 | 11 | 0,63 | tracce | 12,06 | 12 | 1,11 | + | 12,32 | 11,25 | 1,20 | + | 7,70 | 11,80 | 1,30 | +++ | Acet. |
| cb. ellipsoidea II Romani, 939 | 12,28 | 11,15 | 0,22 | - | 12,20 | 11,60 | 0,54 | - | 12,48 | 12 | 0,51 | tracce | 9 | 11,25 | 0,54 | tracce | 5,48 | 11,30 | 0,98 | +++ | Ac. vol. |
| cb. ellipsoidea Sterr. Mil. 1932 | 9,22 | 10,95 | 0,60 | - | 13,26 | 10,50 | 0,91 | - | 12,48 | 11,25 | 0,98 | tracce | 11,86 | 12 | 0,86 | tracce | 5,02 | 11,80 | 1,12 | +++ | Ac. vol. |
| cb. ellipsoidea Sterr. Mil. 1932 | 11,45 | 11,05 | 0,38 | - | 14 | 11,10 | 0,50 | - | 14,40 | 12 | 0,60 | - | 12,80 | 11,25 | 0,61 | tracce | 5,30 | 11 | 0,86 | - | Ac. vol. |
| cb. ellipsoidea bria, 1933 | 6,16 | 10,95 | 0,74 | - | 11,72 | 10,50 | 0,90 | - | 14,30 | 10,30 | 0,91 | - | 12,40 | 10,50 | 0,91 | + | 5,10 | 10,25 | 1,08 | - | Ac. vol. |
| cb. ellipsoidea II Romani, 1939 | 7,62 | 11,70 | 0,55 | - | 11,56 | 10,55 | 0,70 | - | 13,80 | 10,30 | 0,85 | - | 12,32 | 11,05 | 1,22 | - | 4,80 | 12 | 1,28 | - | Ac. vol. |
| cb. ellipsoidea anti, 1936 | 10,66 | 10,55 | 0,61 | - | 11,20 | 10,70 | 0,91 | - | 13,58 | 11 | 1,08 | - | 10,76 | 10,80 | 1,26 | tracce | 6 | 11,70 | 1 | - | Acet. |
| cb. ellipsoidea anti, 1936 | 10,50 | 10,60 | 0,72 | - | 13,58 | 10,15 | 0,65 | - | 13,26 | 11,70 | 0,91 | + | 11,40 | 10,75 | 1,04 | + | 4,40 | 11,10 | 1,05 | + | Ac. vol. |
| cb. el. v. umbra bria, 1933 | 7,02 | 11,95 | 0,86 | - | 11,62 | 11,20 | 0,87 | - | 14,30 | 12 | 0,90 | - | 12,20 | 11 | 1,17 | + | 7,56 | 12 | 0,99 | - | Ac. vol. |
| cb. el. v. major bria, 1935 | 11,30 | 11,50 | 0,68 | - | 12,30 | 12 | 0,82 | - | 13,58 | 11 | 0,91 | - | 9,90 | 10,75 | 0,84 | tracce | 5 | 11 | 0,95 | + | Ac. vol. |
| cb. Bayanus bria, 1933 | 6,98 | 11,70 | 0,44 | - | 12,40 | 4,3 | 0,81 | - | 12,64 | 11,25 | 0,60 | + | 12,22 | 11,05 | 0,72 | + | 5,16 | 10,90 | 0,82 | + | Ac. vol. |
| cb. ovarius anti, 1936 | 11,72 | 10,10 | 0,72 | - | 12,15 | 11,95 | 0,46 | - | 11,60 | 12 | 0,76 | - | 11,10 | 12 | 0,45 | - | 5,06 | 11,09 | 0,43 | + | Ac. vol. |
| cb. italicus anti, 1936 | 8,18 | 11,80 | 0,54 | - | 11,40 | 10,25 | 0,87 | - | 12,20 | 11,25 | 0,88 | - | 11,26 | 11,10 | 1,18 | - | 4,62 | 11,25 | 1,15 | - | Ac. vol. |
| isoacch. Pomb- poll. 1939 | 1,60 | 10,20 | 0,33 | - | 8,58 | 10,20 | 1,28 | ++ | 12,94 | 9,75 | 1,20 | + | 12,70 | 9,65 | 1,33 | + | 4,60 | 10,20 | 1,32 | +++ | Ac. vol. |
| ultrapora Rosci bria, 1933 | 9,50 | 11,70 | 0,08 | - | 10,80 | 11 | 0,23 | - | 10,66 | 11,25 | 0,27 | - | 9,30 | 1 | 0,19 | - | 5,58 | 11,10 | 0,39 | - | Ac. vol. |
| ultrapora Rosci II Romani, 1931 | 8,86 | 10,80 | 0,11 | - | 10,10 | 11 | 0,50 | - | 11,72 | 11,25 | 0,63 | - | 8,30 | 10,40 | 0,54 | - | 5,30 | 10,60 | 0,80 | - | Ac. vol. |
| ol. polcherziana bria, 1933 | 2,82 | 11,25 | 0,14 | - | 3,36 | 10,80 | 0,16 | - | 4,04 | 10,50 | 0,32 | - | 3,10 | 10,20 | 0,27 | - | 2,68 | 10,30 | 0,43 | - | Ac. vol. |
| ultraacch. ma- s. Umbria, 1933 | 7,50 | 10,10 | 0,49 | - | 8,02 | 10 | 0,68 | ++++ | 8,86 | 9,90 | 0,76 | +++ | 7,10 | 10,10 | 0,74 | +++ | 5,86 | 10,05 | 0,49 | +++ | Ac. vol. |
| ultraacch. apicu- s. Umbria, 1933 | 2,54 | 11,40 | 0,56 | - | 4,60 | 10,05 | 1,10 | tracce | 6,70 | 11,20 | 1,19 | ++ | 5,20 | 11,10 | 0,91 | + | 3,68 | 11,60 | 0,87 | + | Ac. vol. |
| s. Galli R. 1929 | 3,60 | 10,50 | 0,56 | - | 4,88 | 11,25 | 1,05 | tracce | 4,32 | 10,70 | 1,08 | ++ | 5,42 | 11,70 | 0,90 | ++ | 3,36 | 11 | 1,01 | - | Ac. vol. |









15°-17°. L'ottimo per *Schizosacch. Pombe* si deve considerare tra 15°-17° e 25°. Circa i due stipti di *Torulaspora Rosei*, uno ha prodotto più alcol a 15°-17° mentre l'altro dimostra preferenze per temperature più basse e cioè 10°-12°. *Torulopsis pulcherrima* e *Pseudosacch. magnus* hanno dimostrato che la temperatura migliore era quella di 15°-17°. Per i due stipti di *Pseudosacch. apiculatus* si è notato per uno l'ottimo a 25° e per l'altro a 15°-17°.

Anche per l'acidità volatile voglio prima limitare i confronti ad i soli stipti da riportarsi a *Sacch. ellipsoideus* o a sue varietà. Si osserva così che la linea dell'acidità volatile cresce coll'aumentare della temperatura e che generalmente le più forti quantità di acidi volatili si riscontrano per le temperature più elevate. Soltanto per lo stipte 40 è risultato che la più forte produzione di acidi volatili si riscontra a 25°. Ma ciò che è del massimo interesse osservare è la diversa quantità di acidità volatile prodotta dai singoli stipti. Così ad esempio mentre gli stipti 20 e 6 dimostrano scarsa capacità a produrre acidi volatili, specie se vengono presi in considerazione i risultati ottenuti alle temperature fino a 25°; vi sono d'altronde altri stipti come l'1, il 26, il 24 e il 40 che ne producono quantità notevoli anche a temperature relativamente basse. Si può affermare quindi che i singoli stipti appartenenti alla stessa specie *Sacch. ellipsoideus* sono capaci di produrre quantità sensibilmente diverse di acidi volatili pur notandosi generalmente che dette quantità aumentano col crescedere della temperatura di fermentazione.

Per le altre specie da riportarsi al genere *Saccharomyces* si è notato che mentre il *Sacch. Bayanus* e il *Sacch. italicus* hanno un comportamento analogo a quello dimostrato dal *Sacch. ellipsoideus*, il *Sacch. uvarum* mostra un comportamento assai diverso; in questa specie le quantità di acidi volatili formate non risentono dell'azione della temperatura, anzi alle temperature elevate corrispondono quantità più modeste di acidità volatile.

Lo stipte di *Schizosacch. Pombe* ha dimostrato di produrre quantità molto notevoli di acidi volatili e che esse aumentano parallelamente col crescere della temperatura. I due stipti di *Torulaspora Rosei* hanno prodotto quantità diverse di acidi volatili, l'intensità di produzione sembra anche

qui seguire l'elevazione della temperatura, in ogni modo le quantità formate, specialmente prendendo in considerazione lo stipite 63, appaiono molto limitate.

I lieviti apiculati dimostrano, nella produzione di acidità volatile, un andamento assai caratteristico. Sia considerando i due stipiti da riportarsi a *Pseudosacch. apiculatus* come il *Pseudosacch. magnus*, si è osservato che la linea indicante la produzione dell'acidità volatile segue fedelmente quella della produzione alcolica, cioè essa mentre è bassa a temperatura di 5°-6° aumenta sensibilmente per raggiungere il massimo a 15°-17° per poi decrescere a temperature più elevate. Tra le due specie di apiculati si nota che le forme da riportarsi a *Pseudosacch. apiculatus* producono, concordemente a quanto è stato da altri osservato (17), quantità di acidi volatili assai più forti di quelle fornite da *Pseudosacch. magnus*. Lo stipite di *Torulopsis pulcherrima* dimostra capacità a formare quantità limitatissime di acidi volatili che sembra aumentino col crescere della temperatura di fermentazione.

Anche ora, come precedentemente si era osservato, le quantità di acidi volatili riscontrate appaiono piuttosto elevate, è probabile che in parte ciò dipenda dall'elevata concentrazione zuccherina del mosto.

In ricerche precedenti si è dimostrato che forse tra la produzione di acetoina e la genesi dell'acidità volatile esisteva qualche rapporto (18), in altre indagini successive si è osservato che pur notandosi generalmente che l'acetoina era presente nei materiali fermentati ad alto contenuto di acidi volatili esistevano liquidi con bassa acidità volatile e forte contenuto di acetoina ed altri nei quali a forti quantità di acidi volatili non corrispondeva formazione di acetoina.

Le presenti ricerche portano un po' più di chiaro sull'interessante argomento. Così ad esempio, nelle precedenti ricerche, era stato osservato che l'acetoina nei mosti fermentati da *Sacch. ellipsoideus* era nulla o presente in minime tracce, queste indagini dimostrano invece chiaramente che la produzione di acetoina è profondamente diversa nei singoli stipiti. Ritengo necessario avvertire però che per le indagini precedenti venne usato costantemente lo stipite 20 il quale anche presentemente ha fornito il medesimo reperto. Delle 10 culture da riportarsi a *Sacch. ellipsoideus* o a sue varietà, tutte hanno formato quantità più o meno sensibili di acetoina meno lo stipite 26 per il quale detto chetoalcol non è stato mai riscontrato. Vi sono alcuni stipiti come l'1% ove l'acetoina si forma in qualsiasi condizione sperimentata pur presentandosi in maggiore quantità a temperature elevate; un quasi analogo comportamento, rispetto allo stipite 1, mostrano gli stipiti 31 e 6 ove l'acetoina è risultata mancante soltanto per le temperature di fermentazione di 5°-6° e 10°-12°. Gli altri stipiti infine dimostrano di produrre piccole quantità di acetoina e per temperature di fermentazione generalmente elevate. In complesso si nota un parallelismo tra produzione di acetoina e acidità volatile in quanto la prima cresce coll'aumentare della seconda. Anche qui però il fatto non si può generalizzare e dimostrazione evidente è il comportamento dello stipite 26 nel quale a quantità abbastanza elevate di acidità volatile non corrisponde formazione di acetoina.

Per le altre specie di *Saccharomyces* i risultati ottenuti sono molto diversi.

Così mentre per Sacch. Bayanus la produzione di acetoina è molto simile a quanto si è notato per Sacch. ellipsoideus, in Sacch. uvarum, nel quale la produzione di acidi volatili è assai limitata, l'acetoina è stata riscontrata soltanto a temperatura di 30° e in piccole quantità. Infine Sacch. italicus mostra un comportamento del tutto identico allo stipite 26 del Sacch. ellipsoideus; cioè anche in questa specie l'acetoina non è stata mai riscontrata nemmeno in tracce pur notandosi acidità volatile piuttosto forte specialmente per temperature di fermentazione elevate.

I due stipiti di Torulaspora Rosei e la Torulopsis pulcherrima hanno confermato quanto era stato visto in precedenza. Queste specie non sono capaci di formare acetoina e la produzione di acidità volatile appare generalmente assai limitata. Disponendo in laboratorio di una serie di stipiti dei due blastomiceti verranno condotte ulteriori più vaste indagini in proposito.

Per lo stipite di Schizosacch. Pombe sembra esistere un parallelismo perfetto tra acidi volatili e acetoina; infatti quest'ultima manca nel liquido fatto fermentare a bassa temperatura ove la quantità di acidità è molto bassa e si fa man mano più forte alle temperature più elevate alle quali l'acidità volatile aumenta sensibilmente.

Tra i lieviti apiculati, la specie indicata come Pseudosacch. apiculatus forma sensibili quantità di acidità volatile e discrete di acetoina e tra questi composti è evidente una certa dipendenza. Infatti l'acetoina non è stata riscontrata o è stata trovata soltanto in tracce quando l'acidità volatile era molto bassa, precisamente ciò si è verificato per temperature di fermentazione piuttosto basse o molto elevate. Infine Pseudosacch. magnus mostra un comportamento del tutto particolare. Questa specie si è dimostrata capace di formare molto grandi quantità di acetoina meno che per la temperatura di fermentazione di 37° alla quale non è stata riscontrata. Per contro a queste forti quantità di acetoina corrisponde un'assai limitata produzione di acidità volatile.

Dal complesso del lavoro eseguito si possono trarre diverse conclusioni che qui riassumo.

1) Sono state eseguite indagini chimiche su liquidi provenienti da un medesimo mosto posto a temperature molto varie e seminato con 20 diversi stipiti di blastomiceti.

2) L'inizio della fermentazione è rapido per tutte le culture alle temperature elevate ed esso ritarda col diminuire della temperatura. A temperature molto basse, di 5°-6°, la fermentazione si manifesta tardivamente e viene proseguita molto stentatamente.

3) La produzione di alcol è fortemente diversa nelle varie specie e nelle diverse varietà e razze appartenenti ad una medesima specie.

4) Le maggiori produzioni di alcol sono state riscontrate generalmente per temperature di fermentazione di 15°-17°, pur notandosi in alcune specie, varietà e razze che l'ottimo della produzione alcoligena era alla temperatura di 10°-12° o di 25°.

5) Le produzioni di acidità volatile sono fortemente diverse nelle singole specie e anche in seno alle diverse varietà e razze del Sacch. ellipsoideus.

A temperature basse le quantità di acidi volatili appaiono assai limitate; esse aumentano col crescere della temperatura ma, mentre nelle razze e varietà del Sacch. ellipsoideus l'acidità volatile aumenta anche a temperatura elevata, per i lieviti apiculati essa raggiunge il suo massimo a temperatura di 15°-17° e poi tende a decrescere.

6) La produzione di acetoina è molto varia nelle singole specie. I lieviti apiculati, specialmente nella specie Pseudosacch. magnus, lo Schizosacch. Pombe, formano quantità notevoli di detto chetoalcol; per contro gli stipiti di Torulaspora Rosei e la Torulopsis pulcherrima non ne formano mai.

7) Le singole varietà e razze di Sacch. ellipsoideus hanno attitudine molto diversa a formare acetoina. Alcuni stipiti ne producono soltanto in tracce più o meno sensibili, altre quantità più forti, mentre per uno stipite l'acetoina non si è mai riscontrata.

8) La produzione di acetoina ha generalmente un andamento parallelo a quello dell'acidità volatile. Infatti nelle forme da riportarsi a razze o varietà del Sacch. ellipsoideus l'acetoina aumenta col crescere della temperatura mentre nei lieviti apiculati essa aumenta fino a temperature di 25° e poi decresce.

9) Si conferma dunque il fatto già osservato altre volte che nei liquidi contenenti forti quantità di acidi volatili si riscontrano notevoli produzioni di acetoina pur notandosi delle specie nelle quali a quantità molto elevate di acidità volatile non corrisponde formazione di acetoina e altre nelle quali a formazione elevate di acetoina, riscontrate a tutte o a quasi tutte le temperature saggiate, corrispondono quantità relativamente basse di acidi volatili.

10) Si conclude pertanto che il chimismo dei blastomiceti è molto diverso nelle singole specie ed in seno alle varietà o alle razze di una medesima specie e che esso è variamente influenzato dalla temperatura alla quale si svolge il fatto fermentativo.

11) I risultati ottenuti dimostrano chiaramente che la pratica enologica si può sensibilmente avvantaggiare dall'uso di stipiti diversi di Sacch. ellipsoideus, e forse anche di altre specie saccaromicetiche, per la formazione di mosti-lieviti da vinificazione da usarsi in zone con caratteristiche ambientali molto diverse.

RIASSUNTO

Vengono riferiti i risultati ottenuti facendo fermentare a varie temperature uno stesso mosto seminato con 20 diversi stipiti di blastomiceti. Si è osservato che il chimismo è fortemente diverso non soltanto nelle singole specie ma anche in seno alle varietà e razze appartenenti ad una medesima specie e che esso è variamente influenzato dalla temperatura di fermentazione. Si conclude che la pratica enologica può sensibilmente giovare di speciali stipiti di Sacch. ellipsoideus, e forse anche di altre specie di saccaromiceti, per la formazione di mosti-lieviti da vinificazione da usarsi in zone con caratteristiche ambientali molto differenti.

ZUSAMMENFASSUNG

Verfasser berichtet über die Resultate die er mittels der Gärung bei mehreren Temperaturen eines gleichen, mit 20 verschiedenen Blastomyce-
tebstämmen beimpften Mostes erhalten hat. Es ist beobachtet worden, dass
der Chemismus nicht nur für die einzelnen Arten sehr verschieden ist son-
dern auch für Sorten und Rassen die ein und derselben Art angehören und
dass derselbe von der Gärungstemperatur verschiedenartig beeinflusst wird.

Verfasser schliesst, dass die oenologische Praxis aus der Anwendung
besonderer Stämme des *Sacch. ellipsoideus*, und vielleicht auch anderer Sac-
charomycetenarten, bei der Erzeugung der Most- Hefen (wdche zur Wein-
stellung in Gegenden mit sehr verschiedenen ambientalen Bedingungen dienen
sollen) einen grossen Nutzen ziehen kann.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *Castelli* - Indagini chimiche sui blastomiceti. « Ann. di Microbio-
logia », vol. I, fase. 6, 1941.
- (2) *Ventre* - Les levures en vinification. « Ann. des fermentations »,
t. 2, n. 5, 1936.
- (3) *De' Rossi* - I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra.
Rel. IV^a Congr. Int. della vigna e del vino - Lausanne 1935.
- (4) *Castelli* - I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico
e zone limitrofe. « Nuovi Annali dell'Agricoltura », Anno XIX, 1939.
- (5) *Castelli* - Ancora sugli agenti della fermentazione vinaria nel
Chianti classico. « Nuovi Annali dell'Agricoltura », Anno XIX, 1939.
- (6) *Santarelli* - Ricerche di prossima pubblicazione.
- (7) *Ravizza* - Sull'influenza della temperatura e della concentrazione
del mosto sulla fermentazione. « Le Staz. Sper. Agrar. », v. XIX, fasc. II, 1890.
- (8) *Fonseca* - Influenza della temperatura sulla fermentazione alcolica.
« Le Staz. Sper. Agrar. », vol. XXI, fase IV, 1891.
- (9) *Müller Thurgau* - citato da De' Rossi in « Microb. Agrar. e Tec. »,
pag. 506, U.T.E.T. 1927.
- (10) *Mensio e Forti* - « Enologia », pag. 43, U.T.E.T. 1928.
- (11) *Briganti, Rossi e Ulpiani* - La vinificazione bassa. « Ann. di Tec.
Agrar. », Anno VI, fase. IV, 1933.
- (12) *Osterwalder* - Von Kaltgärhefen und Kaltgärung. « Zent. für
Barkt », 2 Abt., Band. 90, n. 9-13, 1934.

(13) *Kroemer e Krumbholz* - Beobachtungen über Kaltorganismen von Obst und Traubenmosten. «Landw. Jahrb.», 1930.

(14) *Porchet* - Biologie des levures provoquant la fermentation alcoolique a basse température. «Ann. des fermentations», t. IV, n. 10, 1938.

(15) *Casale* - Esperienze di fermentazione a bassa temperatura. - X° Congr. Int. de Quimica pura y aplicada - Madrid 1934.

(16) *Tarantola* - La preparazione dell'Asti Spumante con la fermentazione a bassa temperatura. «L'Italia Agricola», Anno 74, n. 4, 1937.

(17) *De' Rossi* - I lieviti apiculati della fermentazione vinaria. «Le Staz. Sper. Agrar.», vol. 53, 1920.

(18) *Antoniani, Candia e Castelli* - Contributi alla conoscenza del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati. «Ann. di Microbiologia», vol. I, fasc. III, 1941.

Sull'intervento microbico nei processi di mobilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del terreno agrario

Dott. I. Politi (Vice direttore)

(Ricevuto il 21 ottobre 1941-XIX)

È noto che, applicando il procedimento dello Schloesing per la estrazione delle sostanze umiche del terreno, si perviene in realtà alla separazione di complessi colloidali elettronegativi, costituiti, oltre che da sostanza organica, da silice, alluminio, ferro ed acido fosforico. Complessi colloidali di questa natura furono studiati da Antoniani e Politi (1), dai quali, tra l'altro, è stato posto in evidenza che la quantità di acido fosforico legato ai complessi medesimi rappresenta una frazione cospicua del fosforo totale del terreno; Politi (2) poté infatti accertare che nei terreni ordinari essa corrisponde frequentemente ad oltre il 70-80 % del fosforo totale. Le combinazioni di codesta natura costituiscono quindi con ogni probabilità l'essenziale riserva fosforata del terreno agrario ed in pari tempo, verosimilmente, una tappa intermedia obbligata nel ciclo di trasformazioni cui soggiace il fosforo nel terreno stesso. Del resto e per quanto non siano stati del tutto chiariti i legami fra i costituenti dei predetti complessi colloidali, cui nel terreno si trovano indubbiamente legate anche altre basi — particolarmente calcio e magnesio —, è pure risultato che l'acido fosforico vi si trova sotto forma di combinazioni dotate di notevole stabilità e quindi pressochè del tutto immobilizzato e solo lentamente accessibile alla vegetazione.

Alcune esperienze, compiute secondo le indicazioni del metodo Neubauer, hanno infatti dimostrato chiaramente che l'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali, impiegati allo stato di gel, non subisce una apprezzabile utilizzazione da parte delle piante. Utilizzazione apprezzabile si ha invece impiegando gli stessi complessi previamente sottoposti a disidratazione mediante essiccamento su ac. solforico. Ciò s'accorda con una vecchia osservazione del Tacke (3) il quale aveva notato che alcuni terreni ricchi di sostanza organica si rivelano fosfocarenti se impiegati come tali, mentre manifestano un certo contenuto di fosforo assimilabile se previamente sottoposti ad essiccamento a 50°. È degna di rilievo, in proposito, l'interpretazione che di questo fenomeno diede più tardi il van Bemmelen (4), il quale lo ritenne dovuto all'esistenza di combinazioni d'assorbimento dell'acido fosforico coi colloidali umici, combinazioni che, non accessibili come tali alla vegetazione, lo diverrebbero per effetto di un processo dissociativo conseguente alla disidratazione. A prescindere dal fatto che le combinazioni fosforate non assimilabili non rispondono ai requisiti delle combinazioni d'assorbimento, che

secondo il significato attualmente attribuito ad esse, sono ritenute accessibili alla vegetazione, il concetto del van Bemmelen può essere accettato anche per i predetti complessi umico-minerali del terreno, nel senso che la possibilità di utilizzazione del fosforo ad essi legato è subordinata allo svolgersi di processi che, allentando i legami fra i componenti dei complessi medesimi, rendano libero l'acido fosforico. Particolarmente importante, sotto questo aspetto, appare l'attività degli agenti microbici che presiedono alle ultime fasi di decomposizione della sostanza organica del suolo, ossia alla degradazione del componente umico dei complessi colloidali.

La mobilizzazione del fosforo del terreno è stata oggetto di studio da parte di diversi ricercatori che hanno riconosciuta e indagata l'influenza di vari fattori fisici e chimico-fisici; grande importanza è stata così attribuita ai movimenti del calcio (Hibbard) (5), dovuti a puri fenomeni fisico-chimici o provocati da azioni microbiche (Castellani) (6). Con gli studi sinora compiuti non è stata invece indagata, almeno per quanto mi consta, l'influenza esercitata dai microrganismi sulle combinazioni fosforato umico-minerali, attraverso le loro azioni di decomposizione della sostanza umica (¹); anche per quanto si è fatto osservare in precedenza, è invece logico ritenere che essa abbia importanza quale causa di modificazioni nella stabilità delle combinazioni dell'acido fosforico coi complessi umico-minerali.

Difatti, come mi risulta da comunicazione verbale, Arnaudi ha potuto ottenere (in ricerche rimaste inedite) lo sviluppo di alcuni microrganismi, particolarmente di ifomiceti, su di un substrato costituito da uno di questi complessi, come fonte esclusiva di carbonio, azoto e fosforo, e da sali minerali; ciò sta ad indicare che il fosforo dei complessi in parola è effettivamente accessibile a certi microrganismi che molto probabilmente ne operano una non trascurabile dissoluzione, come del resto ha potuto desumere lo stesso Arnaudi.

Pertanto mi è parso utile riprendere le ricerche sull'interessante quesito e di esse espongo i risultati ottenuti.

Per l'esecuzione delle ricerche ho impiegato un complesso colloidale estratto da un terreno di prato irriguo. La tecnica seguita può essere così riassunta:

Trattamento del terreno con HCl - 1% in eccesso;
Eliminazione dell'HCl per decantazione e ripetuti lavaggi con acqua;
Estrazione con NH₄OH diluito a circa 3%;
coagulazione dell'argilla con KCl;
decantazione ed evaporazione di gran parte dell'NH₃;
flocculazione del complesso colloidale mediante lieve acidificazione con

HCl;

— Successive decantazioni e lavaggi con acqua distillata sino a dispersione incipiente del colloide.

— Addizione di KOH sol. N sino a pH = 7.2 e semidispersione.

(¹) L'attività solubilizzante dei microrganismi sui fosfati insolubili è stata invece indagata e dimostrata; in particolare si possono ricordare le esperienze di Perotti e di Verona e Luchetti (7).

La sospensione così ottenuta aveva la seguente composizione sommaria:

| | |
|-------------------------------------|-------|
| residuo secco a 100° | 1.06% |
| Sost. umica - % residuo secco | 64.7 |
| » minerali » » » | 35.3 |
| P ₂ O ₅ » » » | 1.3 |

Per l'insufficiente durata della sedimentazione dell'estratto ammoniacale, il complesso non risultò del tutto privo di argilla, ma questa impurità non poteva avere alcuna influenza sui processi oggetto d'indagine.

La sospensione venne distribuita in Erlenmeyer a fondo largo della capacità di cc. 500, nella quantità di cc. 200 per ognuno. Si allestirono poi 5 prove in doppio mediante le seguenti aggiunte:

| | | | |
|------|--------------------------------------|------|--|
| N. 1 | Mg SO ₄ 7H ₂ O | 2 ‰; | |
| N. 2 | » | » | glucosio 2 ‰ |
| N. 3 | » | » | NH ₄ NO ₃ , 1 ‰ |
| N. 4 | » | » | glucosio 2 ‰ NH ₄ NO ₃ 1 ‰ |
| N. 4 | » | » | glucosio 2 ‰ NH ₄ NO ₃ 1 ‰ |
| N. 5 | » | » | toluolo 1 ‰ (controllo). |

Qualche grammo di terra venne quindi trattato con 20 cc. di acqua sterile: dopo agitazione e deposizione della parte sabbiosa, si decantò il liquido e, addizionandone 1 cc. in tutte le prove, si provvide a inoculare nei singoli substrati i microrganismi del terreno.

I matracci vennero mantenuti a temperatura ambiente (22-25°) ed al buio per due mesi. Ad eccezione delle prove di controllo, si poté osservare dopo alcuni giorni, lo sviluppo di qualche vegetazione ifomicetica superficiale; nelle prove N. 2 e 4, inoltre lo svolgimento di bollicine di gas. Mano a mano sul fondo di tutti i matracci si veniva raccogliendo un sedimento che nelle prove di controllo appariva come semplice deposito di argilla; di simile aspetto era pure quello delle prove N. 3 (complesso addizionato di NH₄NO₃), mentre nelle rimanenti prove il sedimento stesso era di colore decisamente nerastro e perciò da ritenersi costituito, oltre che da argilla, da materia umica nera coagulata.

Trascorsi i due mesi, la determinazione del pH dei liquidi diede i seguenti valori:

| | | | |
|------|----|------|---------------------|
| N. 1 | pH | 7.8 | |
| N. 2 | » | 7.85 | |
| N. 3 | » | 7.85 | (pH iniziale = 7.2) |
| N. 4 | » | 7.9 | |
| N. 5 | » | 6.65 | |

Si osserva subito che nella prova di controllo si ebbe una diminuzione del pH, imputabile con molta probabilità a fenomeni puramente chimico-fisici, dato che per la presenza di toluolo ogni azione microbica era da ritenersi del tutto inibita. Nelle altre 4 prove si ebbe invece una decisa alcalinizzazione, molto probabilmente per formazione di ammoniaca da parte dei microrganismi sviluppatasi a spese della sostanza umica.

Dovendo accertare se le azioni microbiche avevano o no modificato la stabilità delle combinazioni fosforate e dato che, nonostante il sedimentato formatosi, il complesso colloidale era ancora per la massima parte in istato di dispersione, è parso opportuno procedere alla flocculazione del complesso medesimo mediante leggera acidificazione, per poi determinare la concentrazione dell'anidride fosforica nel liquido limpido, facilmente separabile per filtrazione. A tal fine si procedette nel seguente modo: dai singoli matracci si sono prelevate quattro frazioni di 25 cc. esatti, cui si addizionarono quantità diverse, stabilite con alcuni saggi preliminari, di H_2SO_4 , 0.1 N e di acqua distillata, in modo di realizzare per i complessi colloidali delle 5 prove condizioni di pH il più possibile prossime e da portare contemporaneamente a 40 cc. il volume totale del liquido. Si lasciò in riposo per circa due ore, si separò il liquido limpido per filtrazione e si procedette infine alla determinazione esatta del pH e dei contenuti in anidride fosforica ⁽¹⁾. Non sono emerse che lievi differenze in rapporto al grado di acidificazione con cui venne precipitato il complesso colloidale nelle singole prove, cosicchè i contenuti in anidride fosforica determinati sui liquidi possono con tutta tranquillità essere assunti come indici del grado di mobilizzazione del fosforo legato ai rispettivi complessi colloidali.

I dati ottenuti si possono quindi riassumere nelle seguenti cifre, in cui si è fatta pari a 100 la concentrazione dell'anidride fosforica nel liquido separato dalla prova di controllo, desunte dalle determinazioni sui liquidi aventi lo stesso pH:

Da questi dati si deduce agevolmente che le azioni microbiche svoltesi a spese della sostanza umica, oltre che del glucosio nelle prove N. 2 e 4, hanno influito in senso decisamente positivo, come fattore determinante la mobilizzazione dell'acido fosforico del complesso umico-minerale.

Interessanti sono pure le differenze che si possono osservare fra le diverse prove di solubilizzazione; infatti la più accentuata influenza dell'intervento microbico si ebbe nella prova N. 2, in cui al complesso umico-minerale venne addizionato il 2% di glucosio; effetto un po' meno intenso esplicarono i microrganismi nella prova N. 4, in cui, oltre al glucosio, venne addizionato l'1% di nitrato ammonico. Analogamente, maggior influenza si ebbe nella prova N. 1, in cui non venne fatta alcuna aggiunta di sostanze nutritive per i microrganismi, che non nella N. 3 in cui venne addizionato l'1% di nitrato ammonico. Si può così dedurre che mentre il glucosio ha influito in senso positivo, il nitrato am-

⁽¹⁾ Per le determinazioni della anidride fosforica venne applicato il metodo colorimetrico di Briggs (Jour. of biol. Chem. 1933, 53, 13).

monico ha esplicato un'influenza negativa; ne deriva che molto probabilmente l'azione dei microrganismi sulla mobilizzazione dell'acido fosforico del complesso si è verificata specialmente in seguito alla utilizzazione della sostanza unica quale fonte di azoto.

Per una più efficace interpretazione dei risultati ottenuti, giova tener presente che, dato il carattere eminentemente ossidativo della degradazione cui soggiacciono le sostanze umiche nel terreno agrario, la degradazione stessa procede indubbiamente più intensa e profonda che non nelle condizioni delle esperienze descritte. In complesso quindi si può ritenere che la mobilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del suolo abbia luogo, non soltanto attraverso fenomeni fisico-chimici, ma anche ed in larga misura per effetto delle azioni microbiche sulle sostanze umiche. Perciò la funzione della microflora terricola appare di grande importanza pure nei confronti diretti della nutrizione fosforata della vegetazione.

OSSERVAZIONI SUGLI AGENTI MICROBICI DECOMPLEMENTI

LE SOSTANZE UMICHE

Allo scopo di confermare meglio l'influenza delle azioni microbiche nei processi di solubilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del terreno agrario ed anche per poter eventualmente riconoscere a quali microrganismi sia da attribuire sotto questo aspetto un'importante funzione, è parso utile effettuare alcune osservazioni sulla micro-flora sviluppatasi nei substrati delle esperienze sopra descritte. L'esame microscopico dei substrati medesimi permise di constatare che nel corso dei due mesi, al termine dei quali venne accertata la solubilizzazione dell'acido fosforico, s'era avuto un considerevole sviluppo microbico; in tutti i quattro materiali si osservò infatti la presenza di germi diversi: bastoncini, isolati oppure in brevi catene e di differenti dimensioni; forme rotonde ed ovali; batteri sporificanti e spore; filamenti di vario spessore, continui o settati. Evidenti differenze furono inoltre riscontrate fra i singoli substrati; così, in quelli delle prove N. 2 e 4 si poterono osservare degli ammassi costituiti da numerosi piccoli batteri, molti dei quali per le ridotte dimensioni e per la non omogenea colorazione del protoplasma avevano in un certo qual senso l'aspetto di diplococchi; microrganismi dello stesso tipo ma isolati erano però presenti in tutti i quattro substrati.

Per quanto precede è evidente che, data la presenza di una flora microbica assai mista, l'esame microscopico non potè fornire alcun indizio sicuro in merito alla natura degli agenti microbici più attivi nella degradazione della sostanza unica. Tuttavia, a qualche utile indicazione era ancora possibile pervenire attraverso l'identificazione dei microrganismi capaci di più intenso sviluppo sul substrato umico in condizioni spiccatamente aerobiche, cioè in condizioni più prossime a quelle in cui si svolge la vita microbica nel terreno agrario. A tal fine si è operato nel seguente modo: la sospensione umico-minerale della prova di controllo, venne sottoposta ad eliminazione del toluolo, quindi distribuita in scatole Petri

e solidificata con agar all'acqua distillata; si trapiantarono quindi per striscio i microrganismi presenti nei substrati delle precedenti ricerche e si mantenne in termostato a 30°. Dopo pochi giorni, in corrispondenza delle linee di semina venne osservata la formazione di tenue patina, avente una leggera tendenza ad espandersi; oltre a qualche banale vegetazione ifomicetica, nelle piastre seminate col materiale delle prove N. 2 e 4 si constatò inoltre la formazione di alcune piccole colonie giallo grigiastre, rilevate, umide, che continuarono a crescere sino a raggiungere un diametro di circa 2 mm. Furono allestiti diversi preparati dal cui esame microscopico emerse che la microflora sviluppatasi era costituita per la massima parte da microrganismi simili ai corti batteri che, isolati o riuniti in ammassi, erano stati osservati direttamente nelle sospensioni umico-minerali; in proporzioni decisamente minori figuravano bastoncini di maggiori dimensioni dei precedenti ed alcune altre forme microbiche.

Ottenuto nel modo anzidetto un buon arricchimento degli schizomiceti capaci di maggior sviluppo a spese della sostanza umica, si sono allestite delle piastre di isolamento per diffusione, impiegando i due seguenti terreni che permisero di raggiungere perfettamente lo scopo:

a) Succo di letame (ottenuto per spremitura e filtrazione da letame maturo, neutralizzato con H_2SO_4 sino a $pH = 7,3$ e sterilizzato a 115° per 20') - egual volume di agar al 2,5 %;

b) glucosio g. 5; fosfato monopotassico g. 0,5; solfato di magnesio 0,25; cloruro di sodio 0,25; solfato ferroso 0,01; nitrato ammonico 1; carbonato di calcio 1; agar 12,5; acqua distillata 1000; idrato potassico 0,1 N. sino a $pH = 7,3$.

Delle colture pure così ottenute si è quindi iniziato lo studio; in attesa di completare queste indagini ed esporne i risultati in una prossima nota, è interessante far notare sin da questo momento che, tanto dal punto di vista morfologico quanto per diversi caratteri colturali, alcuni dei germi isolati sono apparsi molto simili ai microrganismi che nel corso di altre ricerche erano stati riconosciuti come simbiotici stabili in colture di citofaghe su cellulosa (8). Questa constatazione, che ulteriori osservazioni in corso dimostrano in modo sempre più evidente, appare di un certo interesse, in quanto si ricollega al quesito, tuttora controverso (1), della formazione e della composizione dell'humus e concorre

(1) Infatti mentre alcuni Autori sostengono che gli acidi umici derivino dalla lignina, altri ritengono che essi si formino essenzialmente dalla cellulosa, però entrambe le ipotesi sono basate principalmente sulla formazione di acidi umici sintetici, simili a quelli naturali, a partire rispettivamente da idrati di carbonio (per azioni di acidi o di alcali a caldo) e da composti fenolici (per ossidazione alcalina). D'altra parte dalle ricerche di Hutchinson e Clayton e da quelle di Winogradsky risulta che la sostanza gelatinosa, derivante quale prodotto stabile dall'azione cellulolitica delle citofaghe, è dotata di molte proprietà comuni a quelle delle sostanze umiche. Lo stesso Winogradsky (9), anche attraverso altre considerazioni, attribuisce inoltre ai detti microrganismi una funzione importantissima come produttori di colloide organico del terreno.

La possibilità di formazione biologica di sostanze umiche dagli idrati di carbonio risulta pure dalle ricerche di Quilico (10) il quale ha dimostrato che l'aspergillina prodotta dall'*Aspergillus niger* a partire da un idrato di carbonio, presenta una grande analogia di proprietà fisiche, di composizione e di comportamento chimico con gli acidi umici naturali.

a far ritenere che i colloidali umici del suolo siano effettivamente costituiti, ed in proporzioni forse cospicue, anche da sostanze derivate dalla degradazione della cellulosa ad opera delle citofaghe.

Particolarmente significativo in questo senso è stato l'esito di alcune prove di coltura che si sono effettuate trapiantando su cellulosa (piastre secondo Winogradsky) i germi sviluppatasi nelle piastre con sostanza umica di cui si è detto più sopra; infatti alcuni trapianti hanno dato luogo a debole attacco della cellulosa. I rilievi compiuti consentono quindi di scorgere uno stretto legame di funzioni fra i microrganismi isolati e quelli più strettamente specifici che presiedono alla prima fase di decomposizione della cellulosa nel terreno agrario. Pertanto il proseguimento delle ricerche potrà estendere utilmente le nostre conoscenze sull'interessante argomento.

RIASSUNTO

Le ricerche compiute dimostrano che nella mobilizzazione del fosforo legato ai complessi colloidali del terreno agrario (complessi costituiti da sostanza umica, silice, alluminio, ferro ed acido fosforico) presiedono anche le azioni microbiche di degradazione delle sostanze umiche.

È pure risultato che come agenti microbici particolarmente attivi nei processi di decomposizione delle sostanze umiche del suolo vanno considerati alcuni schizomiceti che, isolati in coltura pura, sono apparsi simili a germi che in altre ricerche furono riscontrati presenti come simbiotici di citofaghe su cellulosa.

ZUSAMMENFASSUNG

Die hier beschriebenen Untersuchungen beweisen, dass an der Mobilisierung des an kolloide Komplexe des Erdbodens gebundenen Phosphors (Komplexe die aus Humussubstanz, Kieselerde, Aluminium, Eisen und Phosphorsäure gebildet sind) mikrobiische Abbauungen der Humussubstanzen beteiligt sind.

Aus diesen Untersuchungen tritt ausserdem hervor, dass bei den Abbauprozessen der Humussubstanzen des Erdbodens einige Schizomyceten als besonders tätige Agentien zu betrachten sind. In Reinkultur isoliert, sehen dieselben den Mikroorganismen ähnlich, die bei früheren Untersuchungen auf Zellulose, als Symbionten der Cytophagen, aufgefunden worden sind.

BIBLIOGRAFIA

(1) *C. Antoniani* - Sui complessi colloidali del suolo.

Nota I (Rend. R. Ist. Lomb. di Sc. e lett. 1930. 63, fase. II-V)

Nota II (» » » » » 1931. 64, » XI-XV)

Nota III (» » » » » 1932. 65, » I-V)

Nota IV (» » » » » 1932. 65 » XI-XV)

C. Antoniani e *I. Politi* - Sui complessi colloidali del suolo. Nota V (Rend. R. Ist. Lombardo di Scienze e Lettere 1933, 66, fasc. I-V).

(2) *I. Politi* - Sui complessi colloidali del suolo. Nota VI. Sulle combinazioni colloidali organo-fosforate del terreno. (Rend. R. Ist. Lombardo di Sc. e Lett. 1933, 66, fase. I-V).

(3) *B. Tacke* - Neue Beitrage zur Chemè der Humusböden (Chem. Zeit. 1756, 19, 2°).

(4) *Van Bemmelen* - Die Absorptionverbindungen und das Absorptionvermögen der Ackererde (Landwirtsch. Vers. Stat. 1888. 35).

(5) *P. L. Hibbard* - Soil Sci., 1931-39, 337-359.

(6) *E. Castellani* - Sulla liberazione per attività microbiologica del fosforo legato al complesso colloidale del suolo (Atti VI Congr. Naz. di Micr. Milano 1937, pag. 730).

(7) *R. Perotti* - Sul ciclo biochimico dell'anidride fosforica nel terreno. Roma, 1909.

O. Verona e G. Luchetti - La dissoluzione del fosforo per attività dei microbi della « rizosfera ». (Boll. del R. Ist. Sup. Agrario di Pisa 1931, 7).

(8) *I. Politi* - Alcune osservazioni sui microrganismi aerobi decomponenti la cellulosa - Tentativi di isolamento in coltura pura (in corso di stampa nel Boll. Sez. It. della Soc. Intern. di Microb.).

(9) *S. Winogradsky* - Etudes sur la microbiologie du sol. Sur la degradation de la cellulose dans le sol. (Ann. Inst. Pasteur 1929, 43 pag. 549).

(10) *A. Quilico* - I pigmenti neri animali e vegetali (Ed. Fusi Pavia, 1937).

Ricerche sui fermenti lattici (Nota III)

Dott. I. Politi (Vice Direttore)

(Ricevuto il 21 ottobre 1941-XIX)

OSSERVAZIONI SUL POTERE PROTEOLITICO DEI FERMENTI LATTICI NEI CONFRONTI DELL'ANDAMENTO DEI PROCESSI DI ACIDIFICAZIONE DEL LATTE E DEI CARATTERI FISICI DEL COAGULO PRESAMICO

Nel piano delle ricerche iniziate da questa Stazione sul complesso problema delle proprietà casearie del latte, in rapporto alle influenze che talune condizioni, e specialmente il tipo di alimentazione del bestiame, esplicano sulle proprietà medesime, è parso utile effettuare dapprima alcune indagini preliminari, aventi per oggetto alcune caratteristiche fisiologiche dei fermenti lattici. L'importanza fondamentale dell'intervento di cotesti microrganismi nei processi caseari sta infatti ad indicare, dati i fini che si perseguono, quanto sia utile possedere conoscenze sufficientemente precise e complete intorno alle reciproche correlazioni ed influenze che esistono o che si stabiliscono fra la mutevole composizione del latte e gli agenti, enzimatici e microbici, che presiedono alle sue trasformazioni. E' anzi nostra convinzione che solo in virtù di adeguate conoscenze sui caratteri fisiologici e culturali dei fermenti lattici sarà possibile dare un indirizzo razionale e sistematico allo studio delle proprietà e delle attitudini casearie del latte; inoltre è evidente che le indagini così condotte potranno recare un efficace contributo anche per fini più propriamente tecnologici.

Le osservazioni di cui si è riferito nella nota precedente. (Questi Annali 1930 I pag. 213) hanno posto in luce che a condizionare lo sviluppo dei vari fermenti lattici nel latte intervengono principalmente le seguenti caratteristiche 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 speciali fattori di accrescimento o stimolanti. Degna di particolare attenzione è, fra queste caratteristiche, la differente capacità di utilizzare le proteine del latte, in quanto la maggior parte dei costituenti azotati di questo è appunto data da proteine complesse allo stato colloidale, la cui assimilazione da parte dei microrganismi non può aver luogo se non attraverso un processo d'idrolisi. Alle proprietà proteolitiche dei fermenti lattici va quindi attribuita una grande importanza, sia perchè da esse dipende la rapidità dello sviluppo e l'intensità dell'acidificazione prodotta dai germi stessi, sia perchè le proprietà medesime interessano direttamente la caseina e le sue trasformazioni nei prodotti caseari. Difatti, l'intensa partecipazione dei fermenti lattici ai processi di maturazione dei formaggi è, si può dire, da tutti accettata, anche se le nostre conoscenze al riguardo sono piuttosto sommarie ed incomplete.

Muovendo da queste considerazioni si sono compiute le ricerche di cui segue l'esposizione; alcune di esse concernono l'influenza dell'azione proteolitica del caglio sui processi di acidificazione lattica ed altre l'influenza dello sviluppo di vari fermenti lattici sui caratteri fisici del coagulo pre-samico.

I. - INFLUENZA DEL PRESAME SUI PROCESSI DI ACIDIFICAZIONE DEL LATTE.

Queste ricerche consistettero essenzialmente nel controllo dell'acidificazione subita dal latte addizionato, oltre che di fermenti lattici, di una piccola quantità di presame (in proporzioni non molto discoste da quelle che si impiegano in pratica per la preparazione dei formaggi).

Si è operato con del latte crudo, istituendo anche una duplice prova di acidificazione, con aggiunta o non di caglio ma senza addizione di microrganismi. La tecnica seguita fu la seguente:

Si sono centrifugati cc. 20 di coltura microbica ben sviluppata in siero-peptone; il sedimento venne poi sospeso in 10 cc. di acqua sterile; 2 cc. della sospensione microbica così ottenuta vennero addizionati a 100 cc. di latte, previamente portato a 30°, e quindi agitato; si prelevarono sterilmente 30 cc., distribuendoli in 4 provette sterili, ed al rimanente si addizionò cc. 0.7 di soluzione di caglio in polvere (titolo 1:150.000) al 5 %; dopo nuova agitazione, si distribuì in provette, ponendo queste e le precedenti a 30° in bagno di Ostwald. Si determinò quindi il grado di acidità (pH) del latte dopo ore 2,45', 6,45', 23 e 48.

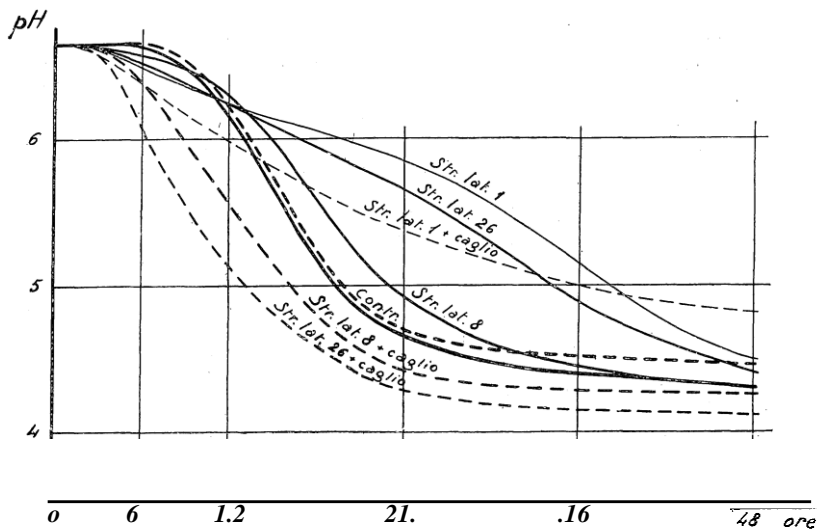
Per questa indagine furono impiegati gli stessi streptococchi lattici esaminati con le ricerche esposte nella nota precedente; i risultati ottenuti sono raccolti nella tab. I ed in parte riprodotti dal diagr. I.

Tab. I - INFLUENZA DEL CAGLIO SULL'ANDAMENTO DELLA ACIDIFICAZIONE DEL LATTE - pH iniziale del latte = 6,65.

| Coltura microbica aggiunta | pH dopo ore | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|
| | 2,45' | | 6,45' | | 23 | | 48 | |
| | latte | latte + caglio | latte | latte + caglio | latte | latte + caglio | latte | latte + caglio |
| | 6,65 | 6,67 | 6,62 | 6,65 | 4,7 | 4,7 | 4,32 | 4,45 |
| Str. latt. ceppo 1 | 6,6 | 6,57 | 6,45 | 6,33 | 5,9 | 5,4 | 4,48 | 4,8 |
| » 8 | 6,6 | 6,6 | 6,55 | 6,3 | 5 | 4,45 | 4,3 | 4,25 |
| » 12 | 6,63 | 6,62 | 6,53 | 6,35 | 5,7 | 5,5 | 4,4 | 4,75 |
| » 14 | 6,6 | 6,57 | 6,5 | 6,28 | 5,25 | 4,53 | 4,35 | 4,32 |
| » 17 | 6,6 | 6,61 | 6,48 | 6,35 | 5,65 | 5,4 | 4,35 | 4,7 |
| » 26 | 6,6 | 6,58 | 6,5 | 5,95 | 5,7 | 4,32 | 4,38 | 4,1 |

Ponendo ora a confronto gli andamenti dell'acidificazione subita rispettivamente dal latte e dal latte sottoposto contemporaneamente all'azione del caglio, è agevole rilevare che, ad eccezione della prova senza aggiunta di microrganismi, l'influenza del caglio si è manifestata in modo ben evidente accelerando ed intensificando il processo di acidificazione. Perciò, anche se l'effetto non è stato sentito nella stessa misura dai singoli ceppi, il che è senz'altro da attribuirsi alle diverse caratteristiche fisiologiche di questi, appare logico dedurre che il caglio esplica un'azione favorevole sullo sviluppo degli streptococchi lattici in genere; con ogni probabilità in virtù del noto potere proteolitico da esso posseduto e per il quale si ha formazione di proteosi, di peptoni e forse anche di piccole quantità di aminoacidi. Questa interpretazione è del resto in accordo con i risultati delle precedenti ricerche, le quali hanno dimostrato che la piuttosto lenta e limitata acidificazione prodotta da alcuni streptococchi lattici deve essere attribuita essenzialmente ad assai scarsa attività proteolitica, per cui i microrganismi medesimi risultano particolarmente sensibili alla presenza di piccole quantità di composti azotati più facilmente assimilabili delle proteine del latte.

Considerando ora il decorso dell'acidificazione spontanea subita dal latte, senza e con aggiunta di caglio, non è dato rilevare che lievi differenze fra le due prove. Ciò dipende, con ogni probabilità, dal fatto che l'acidificazione è stata qui determinata da una flora microbica mista, comprendente fermenti lattici ed anche altri germi che hanno svolto, almeno in un primo tempo, una non lieve attività proteolitica.



Diagr. I. - Influenza del caglio sull'andamento dell'acidificazione del latte prodotta da alcuni Streptococchi lattici.

Alla stessa spiegazione conducono pure i risultati di alcune prove di acidificazione spontanea, compiute con latti addizionati di peptone Witte (nelle proporzioni di 0,05 %, 0,25 %, 2 %), le quali non hanno dato luogo che

a lievi differenze rispetto alle prove di controllo con latte non addizionato di peptone.

L'esame dei risultati ottenuti dà modo di compiere altri interessanti rilievi nei riguardi dell'influenza che l'aggiunta delle colture microbiche ha esplicato sul decorso dell'acidificazione del latte; emergono così le seguenti constatazioni:

— l'aggiunta degli streptococchi è stata seguita da un aumento dell'acidità, mentre nella prova di acidificazione spontanea, senza addizione di microrganismi, il pH ebbe a diminuire in misura apprezzabile soltanto dopo 6 ore; ciò è chiaro, data la quantità dei germi aggiunti in confronto a quelli inizialmente contenuti nel latte;

— trascorse le prime 6-10 ore, l'acidificazione è proceduta con intensità nettamente maggiore nel latte semplice che non in quello addizionato di streptococchi. L'addizione medesima, se si esclude la prima fase dell'acidificazione, ha agito quindi come un ostacolo rispetto al rapido inacidimento determinato dalla microflora già contenuta nel latte.

L'interessante fenomeno può essere agevolmente spiegato se si tengono presenti le assai ridotte attitudini degli streptococchi impiegati, e specialmente di alcuni di essi, ad utilizzare le proteine del latte: infatti, per la loro superiorità numerica, i germi aggiunti hanno fortemente paralizzato la microflora preesistente nel latte e perciò l'acidificazione è proseguita per loro azione pressochè esclusiva e, dopo l'esaurimento dei composti azotati di pronta assimilazione, con una rapidità che è stata in funzione delle loro attitudini, più o meno ridotte, ad utilizzare le proteine complesse.

Nella fermentazione spontanea del latte si ebbe invece lo sviluppo di microrganismi diversi, ivi sicuramente compresi anche germi che, dotati di intensa attività proteolitica, hanno creato nel substrato condizioni più favorevoli per il successivo intenso sviluppo dei microrganismi acidificanti.

Non sono naturalmente da escludere eventuali azioni simbiotiche, ma nel suo complesso il fenomeno appare dominato dalle predette caratteristiche fisiologiche; e sotto questo aspetto le attività svolte dai germi proteolitici ed acidoproteolitici, nella fase iniziale dei processi di inacidimento spontaneo del latte, appaiono di non trascurabile importanza quali cause favorevoli al rapido decorso dell'inacidimento medesimo.

D'altra parte è agevole comprendere come i fermenti dotati di più ridotta capacità proteolitica, possano svolgere, se presenti in numero sufficientemente elevato, un'utile funzione nella conservazione del latte; sia ostacolando lo sviluppo dei microrganismi putrefacenti, sia rallentando lo stesso inacidimento spontaneo.

II. - INFLUENZA DEI FERMENTI LATTICI SUI CARATTERI FISICI DEL COAGULO PRESAMICO.

È risaputo che il processo di coagulazione presamica del latte è fortemente influenzato da molte condizioni, quali la temperatura, il grado di acidità ecc., nonchè da caratteri propri, e più o meno incostanti, del latte stesso; caratteri che a loro volta sono dipendenti dall'età degli animali, dal regime alimentare ecc. Si sa pure che l'influenza medesima si manifesta

sia sull'attività del presame (velocità della coagulazione), sia sui caratteri fisici del coagulo.

È evidente a priori che una grande importanza compete in questo senso alle azioni microbiche, in quanto alle medesime è dovuto l'acidimento del latte; nulla di preciso si può affermare invece circa influenze di altra natura e perciò con le ricerche di cui segue l'esposizione si è voluto indagare in merito a quelle eventualmente connesse allo sviluppo di alcuni fermenti lattici.

Poichè ad espressione sintetica dei caratteri fisici di un coagulo può essere assunta la resistenza che il coagulo stesso offre alla rottura, è parso utile impiegare per le ricerche medesime il dispositivo dinamometrico descritto su questi Annali (Vol. I Fasc. IV pag. 210) e derivato dall'analogo di Hill.

Date le finalità delle esperienze, si è seguita una tecnica diversa da quella indicata da Hill per distinguere i latti che danno un coagulo molle, da quelli a coagulo resistente. Anzi, dovendosi eliminare l'influenza del mutevole comportamento del latte, si sono compiute diverse serie di determinazioni, in modo da impiegare un unico latte per ciascuna di queste.

Il latte, senza alcun trattamento (1), oppure trattato nei modi che saranno indicati, e previamente portato alla temperatura d'esperienza, venne introdotto nella quantità di 250 cc. in bicchiere a forma alta della capacità di 600 cc.; dopo aver mantenuto in bagno termostatico sino al raggiungimento della temperatura di questo, si aggiunse 1 cc. di soluzione al 0,5% di caglio in polvere (titolo 1:150.00); si agitò e si applicò uno dei coltelli di cui è corredato l'apparecchio; si lasciò coagulare e dopo il tempo richiesto dall'esperienza si procedette alla misura della resistenza del coagulo, operando con movimento lento e continuo.

Vennero compiute alcune determinazioni preliminari allo scopo di controllare l'influenza che alcune condizioni fisico-chimiche (temperatura, acidità, aggiunta di CaCl_2) esplicano sulla resistenza del coagulo; ciò soprattutto allo scopo di stabilire le condizioni sperimentali più adatte per le successive prove con microrganismi. I risultati ottenuti sono riassunti nei prospetti seguenti.

INFLUENZA DELLA TEMPERATURA

| Tempi | T = 37° Resistenza del coagulo | Tempi | T = 30° Resistenza del coagulo |
|-------|--------------------------------------|-------|--------------------------------------|
| 30' | 36 | 40' | 23 |
| 45' | 43 | 55' | 34 |
| 60' | 55 | 70' | 40 |
| 75' | 84 | 85' | 54 |

(1) Trattandosi di prove di controllo al latte venne addizionata dell' H_2O distillata in quantità pari al liquido aggiunto nelle altre prove dell'esperienza.

INFLUENZA DEL GRADO DI ACIDITÀ (pH) - TEMPERATURA 37°

| Tempi | pH = 6.6 | pH = 6.45 | pH = 6.3 | pH = 6.03 |
|-------|----------|-----------|----------|-----------|
| 30' | 36 | 60 | 78 | 100 |
| 45' | 43 | 69 | 89 | 104 |
| 60' | 55 | 89 | 105 | 115 |
| 75' | 84 | 94 | 104 | 112 |

INFLUENZA DEI SALI DI CALCIO - TEMPERATURA 37°

| Tempi | latte | latte | latte |
|-------|-------|--------------------------|-------------------------|
| | | CaCl ₂ M /500 | CaCl ₂ M/250 |
| 30' | 58 | 61 | 72 |
| 45' | 63 | 70 | 86 |
| 60' | 70 | 93 | 100 |
| 75' | 71 | 89 | 85 |

Sulla base di codesti risultati, che tra l'altro dimostrarono l'idoneità del procedimento seguito a determinare l'influenza che i vari fattori esplicano sui caratteri fisici del coagulo, vennero stabilite le modalità sperimentali secondo cui procedere all'accertamento dell'influenza esplicita dallo sviluppo dei fermenti lattici. La tecnica prescelta fu la seguente:

Si sottoposero a centrifugazione cc. 30 di coltura microbica di 20-22 ore in siero-peptone; il sedimento venne quindi sospeso in 5 cc. di acqua distillata sterile e addizionato a cc. 400 di latte, previamente introdotti in Erlenmeyer. Si pose in termostato e, controllando in tempi successivi il pH, si attese il raggiungimento di un conveniente grado di acidificazione; dopo di che si prelevarono e si introdussero nell'adatto bicchiere i 250 cc. necessari per la determinazione della resistenza del coagulo presamico; il latte rimasto venne a sua volta introdotto in altro bicchiere più piccolo che assieme al precedente venne immerso in bagno termostatico regolato a $37^{\circ} \pm 0,1$. Dopo aver atteso che il latte si portasse a temperatura costante di 37° , si procedette all'aggiunta del presame e contemporanea misura del pH sul latte del bicchiere piccolo; dopo 30' si determinò la resistenza del coagulo e, nuovamente, il pH raggiunto.

Con lo stesso latte vennero saggiati diversi stipiti di fermenti lattici ed effettuate altresì cinque prove senza semina di microrganismi ma con semplice aggiunta di acido lattico in quantità crescenti e tali da abbracciare il campo delle variazioni di acidità prodotte dai fermenti impiegati. I risultati delle determinazioni sono raccolti nella Tab. II.

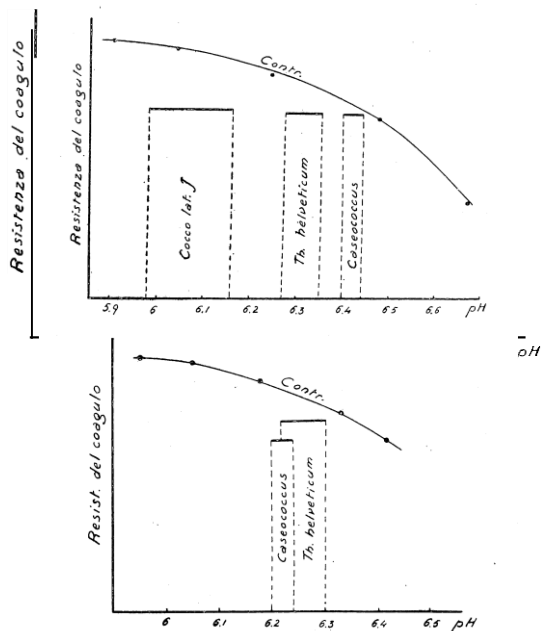
Dall'esame di essi emerge chiaramente che il coagulo ottenuto con latte acidificato per azione degli streptococchi e del *Lact. bulgaricus* ha presentato,

Tab. II - INFLUENZA DELLO SVILUPPO DI ALCUNI FERMENTI LATTICI SULLA RESISTENZA DEL COAGULO PRESAMICO.

| Serie | Al latte si è aggiunto: | pH | Resistenza del coagulo |
|--|--|-------------|------------------------|
| I | -- | 6.73 | 39 |
| | ac. lattico | 6.37 | 80 |
| | » » | 6.22 | 92 |
| | » » | 6.08 | 106 |
| | » » | 5.98 | 107 |
| | Strep. latt. ceppo 1 | 6.1-6.02 | 103 |
| | » » » 8 | 6.05-6.- | 107 |
| | » » » 12 | 6.15-6.1 | 102 |
| | » » » 14 | 6.1-6.05 | 104 |
| | » » » 17 | 6.18-6.15 | 101 |
| | Lact. bulgaricus | 6.38-6.3 | 84 |
| | II | ac. lattico | 6.42 |
| » » | | 6.33 | 86 |
| » » | | 6.18 | 98 |
| » » | | 6.05 | 105 |
| » » | | 5.95 | 107 |
| Th. helveticum | | 6.3-6.22 | 83 |
| Caseococcus Gorini (Acido proteolitico) | | 6.24-6.2 | 76 |
| III | -- | 6.67 | 51 |
| | ac. lattico | 6.47 | 87 |
| | » » | 6.24 | 106 |
| | » » | 6.04 | 117 |
| | » » | 5.9 | 120 |
| | Th. helveticum | 6.35-6.27 | 89 |
| | Caseococcus Gorini (Acido proteolitico) | 6.44-6.4 | 90 |
| | Cocco lattico J. | 6.16-5.98 | 91 |

rispetto al coagulo prodotto con latte acidificato allo stesso grado mediante acido lattico, differenze trascurabili e comprese largamente entro i limiti di approssimazione del metodo. Differenze ben più accentuate, e che non appaiono imputabili ad errori strumentali, si osservano invece nei confronti del *Thermobacterium helveticum*, del Cocco lattico J. e del *Caseococcus* (acidoproteolitico), il cui sviluppo appare pertanto influente sui caratteri fisici del

coagulo presamico, indipendentemente dalla acidificazione prodotta dai germi stessi nel latte (Diagr. II e III). Poichè si sa con certezza che il *Thermobacterium helveticum* e più ancora il Caseococco sono dotati di proprietà caseinolitiche ben più intense di quelle degli streptococchi lattici e del *Lact. bulgaricus*, si può dedurre che la constatata influenza è da attribuirsi, con ogni probabilità, alle suddette proprietà caseinolitiche. Se ora si tiene presente che il grado di acidificazione raggiunto dal latte nelle esperienze sopra descritte non è molto discosto da quello che si raggiunge in alcune lavorazioni casearie, l'azione esplicata dai tre predetti fermenti lattici appare considerevole anche dal punto di vista tecnologico; e ciò sia che la si consideri



Diagr. II e III - Influenza di alcuni fermenti lattici sulla resistenza del coagulo presamico.

nei confronti diretti delle caratteristiche fisiche del coagulo, sia anche dal punto di vista dell'intensità della stessa azione caseinolitica. Del pari è giustificato presumere che in una lavorazione casearia, anche a prescindere dal grado di acidità del latte sottoposto a coagulazione, il coagulo possa presentare caratteri fisici diversi a seconda della natura dei germi che, presenti naturalmente oppure aggiunti per mezzo di colture, si sono sviluppati ed

hanno presieduto all'acidimento del latte stesso. E poichè, come s'è visto, i caratteri fisici del coagulo risultano modificati in misura diversa a seconda del potere caseinolitico dei germi, è logico pensare che dal punto di vista considerato una non trascurabile importanza può verosimilmente competere anche ai tipici batteri proteolitici che, com'è noto, figurano sempre fra i componenti della flora microbica del latte; nonchè a tutto quel complesso di condizioni alle quali sono comunque legati e l'intensità dello sviluppo microbico e il vario prevalere dei diversi microorganismi.

Ovvie ragioni prudenziali non consentono per ora di attribuire alle considerazioni precedenti un valore definitivo; a conclusioni più complete si potrà tuttavia pervenire proseguendo le ricerche sulla base dei risultati ottenuti e secondo l'indirizzo che da essi emerge.

RIASSUNTO

Dalle ricerche compiute sono emersi i seguenti rilievi:

Il presame aggiunto al latte esplica una favorevole influenza sullo sviluppo degli Streptococchi lattici in genere, dei quali accelera ed intensifica l'attività fermentativa; molto probabilmente l'influenza medesima è dovuta alla nota azione proteolitica, per la quale si ha formazione di composti azotati più facilmente utilizzabili delle proteine del latte.

In seguito all'aggiunta di colture di streptococchi lattici dotati di assai ridotta azione proteolitica si ha che, nonostante l'immediato inizio dell'acidificazione, questa, dopo alcune ore, procede con intensità nettamente minore di quella che subirebbe lo stesso latte lasciato acidire spontaneamente.

I fermenti lattici dotati di più scarsa azione sulla caseina non modificano in modo apprezzabile la resistenza del coagulo presamico se non per il solo effetto dell'acidità da essi prodotta. Per contro fermenti che, come il *Thermobacterium helveticum* ed i cocchi acidoproteolitici, siano dotati di un potere caseinolitico più intenso di quello degli Streptococchi lattici, modificano i caratteri fisici del coagulo anche indipendentemente dalla loro attività acidificante.

Si richiama l'attenzione sull'importanza che potrebbe competere ai tipici microrganismi proteolitici, non solo per le trasformazioni da essi determinate, nei costituenti del latte, ma anche per l'influenza delle loro attività sullo sviluppo della microflora acidificante.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den angestellten Untersuchungen ergibt sich folgendes:

Das der Milch zugesetzte Lab übt einen günstigen Einfluss auf die Milchstreptokokken aus, indem es deren Gärungstätigkeit beschleunigt und verstärkt. Höchst wahrscheinlich ist dieser Einfluss der bekannten proteolytischen Tätigkeit zu verdanken, die zur Bildung von leichter verwendbaren stickstoffhaltigen Komplexen der Milchproteine führt. Wenn der Milch Streptokokkenkulturen mit sehr reduzierter proteolytischer Tätigkeit zugefügt

Werden, beobachtet man dass trotz des unmittelbaren Beginnes der Ansäuerung, dieselbe nach wenigen Stunden mit einer viel niedrigeren Intensität fortschreitet als bei der spontan angesäuerten Milch der Fall ist.

Milchfermente die Kasein wenig beeinflussen, verändern die Resistenz des Labgerinnsels nicht merklich, abgesehen von der Wirkung der erzeugten Säure. Im Gegensatz, Fermente die - wie der *Thermobacterium helveticum* und die proteolytische säurebildenden Kokken - eine stärkere Wirkung auf Kasein ausüben als die Milchstreptokokken, ändern die physikalischen Eigenschaften des Gerinnsels, auch unabhängig von ihrem Ansäuerungsvermögen.

Es wird die Bedeutung hervorgehoben welche die echten proteolytischen Mikroben, nicht nur in Bezug auf die von ihnen ausgelosten Umwandlungen der Milchbestandteile, sondern auch auf den Einfluss ihrer Tätigkeiten für die Entwicklung der säurebildenden Keime, besitzen können.