

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

GIUGNO 1942 - XX
VOL. II - FASC. III

ORGANO DELLA STAZIONE SPERIMENTALE
DI BATTERIOLOGIA AGRARIA DI CREMA

DIREZIONE ED AMMINISTRAZIONE: MILANO VIA CELORIA 2

NORME DI COLLABORAZIONE

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

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

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

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

Per gli estratti dei lavori gli Autori dovranno accordarsi direttamente con la Tipografia.

Per la bibliografia si prega di attenersi alle seguenti norme:

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

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

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

Adoperare sempre le seguenti abbreviazioni:

chilogrammo	== Kg	metro	== m	centim quadr	==cmq	minuto 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	== γ	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

G. A. BROSSA - Le fermentazioni dell'Acetobacter Xylinum e la sintesi della cellulosa	pag. 77
S RICCARDO - Lo studio della microflora terricola insediatasi sulle lave vesuviane del 1895-1899	» 93
Dott. P. RENCO - Ricerche su un fermento lattico sporigeno (Bac. Thermoacidificans)	» 109
Prof. A. GRIMALDI - Ulteriori rilievi sulla « stanchezza » del terreno	» 115

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. 170.000.000

BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

CREDITO ITALIANO

BANCA DI INTERESSE NAZIONALE

**SOCIETÀ ANONIMA
CAPITALE L. 500.000.000
RISERVA L. 128.00.000
SEDE SOCIALE: GENOVA
DIREZ. CENTRALE: MILANO**

**OGNI OPERAZIONE E
SERVIZIO DI BANCA**

Le fermentazioni dell'*Acetobacter Xylinum* e la sintesi della cellulosa

G. A. BROSSA

(Ricevuto il 2 marzo 1942-XX)

In questi ultimi anni si è molto parlato di una sintesi batterica della cellulosa a partire dal glucoso. Si tratta della continuazione di vecchie esperienze di A. Brown e di G. Bertrand, recentemente riprese in modo più esauriente da G. Schmidt, H. Hibbert, J. Barsha e Y. Khouvine. Essi trovarono che, coltivando *l'Acetobacter xylinum* su terreni inorganici addizionati a fruttosio, glucoso, galattoso, ecc. si ottengono membrane spesse e tenaci di cellulosa. Tale sintesi dovuta all'*A. xylinum* si ha, secondo Y. Khouvine, anche partendo da alcoli a 4, 5, 6, 7, 8 atomi di carbonio, come pure dalla glicerina, ottenendo, dopo una ventina di giorni, fino al 20 % di cellulosa (dalla mannite). L'*A. xylinum* possiede quindi la facoltà di ossidare gli alcoli nei rispettivi aldosi e chetosi e di polimerizzarli.

Noi abbiamo ripreso con intenti pratici ricerche e studi su queste fermentazioni, che desideriamo rendere noti, facendoli precedere da alcune notizie sulla biochimica dell'*A. xylinum* e di altri batteri acetificanti del gruppo.

La parola fermentazione, nel senso comunemente impiegato, risveglia il concetto di sdoppiamento e di scomposizione. Così parlando di fermentazione alcoolica, si pensa senz'altro allo sdoppiamento dello zucchero in alcool e anidride carbonica e si dimentica che in pari tempi i lieviti producono sinteticamente le sostanze necessarie alla formazione del loro organismo, composto di materiali assai più complessi dello zucchero da cui hanno origine.

I due fenomeni di costruzione e di distruzione decorrono paralleli, e non sempre questi ultimi sono i più importanti. Gli uni e gli altri sono strettamente legati a condizioni di ambiente, quali l'ossigenazione, la nutrizione e la temperatura.

Ad esempio nei lieviti durante la vita anaerobica predominano i fenomeni di scomposizione (formazione di alcool), mentre il contrario avviene nella vita aerobica, in cui prevalgono i prodotti di sintesi nella quale la massima parte degli idrati di carbonio servono alla riproduzione. La sintesi del glicogeno nei lieviti è parimenti legata a condizioni di ambiente e si ha una massima produzione di glicogeno, quando abbondano nel substrato gli idrati di carbonio, mentre, quando questi scarseggiano, il glicogeno scompare.

Se le nostre conoscenze sui fenomeni di decomposizione delle sostanze che prendono parte al ricambio batterico presentano ancora parziali oscurità e numerose lacune, anche più oscure e limitate sono le nostre cono-

scenze sui processi di sintesi, che si verificano nel metabolismo microbico. Oltre la formazione di grassi dagli idrati di carbonio, dimostrata sia negli organismi superiori che nei microrganismi, e oltre la sintesi di sostanze proteiche che avviene ad es. nel metabolismo dei lieviti di varie specie, la condensazione di zuccheri semplici a disaccaridi e a polisaccaridi, fino alla produzione di cellulosa, amidi, glicogeno, gomme e mucilagini, ecc. è certo uno dei processi più diffusi e più interessanti del ricambio microbico.

Vediamo dapprima in quali rapporti morfologici e genetici questi composti sintetici del metabolismo batterico, stiano col batterio che li ha prodotti.

Come è noto, il corpo degli Schizomiceti o Batteri, è unicellulare e consta, come le cellule vegetali in genere, di un protoplasma e di una parete cellulare. Il protoplasma, che è la parte viva della cellula, si suole dividere in una parte interna o endoplasma, ed una parte esterna od ectoplasma. Tra le due non esiste alcuna netta separazione, ma l'ectoplasma è più denso, più rinfangente ed è quello che dà origine alla parete o membrana cellulare, che a noi interessa in modo particolare. La presenza della membrana cellulare è dimostrabile con la colorazione e con la plasmolisi. La porzione esterna di tale membrana, in alcuni schizomiceti (*B. capsulatus*, *B. Pneumoniae*, *Diplococcus pneumoniae*, ecc.) dà luogo alla formazione di una sostanza omogenea, difficilmente colorabile, che prende il nome di capsula. In altri casi essa si rigonfia assumendo l'aspetto di una massa gelatinosa. Tale gelatinificazione della membrana è talora molto evidente ed allora la cellula batterica o le catenelle da essa formate, appaiono avvolte in una massa voluminosa che prende il nome di *zoogleea*: queste forme sono frequenti e caratteristiche dei batteri acetificanti e vanno sotto il nome volgare di *madre dell'aceto*.

Desfosses ¹⁾, in epoca ormai remota della microbiologia, aveva osservato nel succo di bietola o di canna da zucchero la formazione di masse lobate, verrucose della grandezza di una nocciola, di consistenza mucogelatinosa che talora trasformavano in masse semigelatinose tutto il liquido zuccherino. Egli chiamò fermentazione viscosa tale trasformazione. Pasteur attribuì una origine microbica a questa *gomma di zuccherificio* e la sua ipotesi fu in seguito confermata da vari ricercatori, che constatarono la presenza di uno speciale germe, *l'Ascococcus mesenteroides (Leuconostoc)* ²⁾.

Formazioni mucilaginose furono spesso osservate in preparazioni farmaceutiche, prodotti industriali, latte, pane ed altri generi alimentari.

Queste ed altre osservazioni hanno dimostrato che tali fermentazioni sono dovute all'azione delle più svariate specie batteriche.

Secondo Benecke ³⁾ sarebbe errato il credere che la presenza o l'assenza degli involucri mucosi o gelatinosi costituisca un carattere differenziale e specifico di un dato schizomicete. Infatti alcuni batteri purpurei (*Chromatium*, *Rhodotheca* e altri) talvolta hanno vivaci movimenti, tal'altra invece sono immobili e circondati da membrane gelatinose. Alcune specie patogene formano la capsula solo nell'organismo e non la formano nei terreni di coltura (*B. capsulatus*). Lo stesso *Leuconostoc mesenteroides*,

che è caratterizzato dal suo voluminoso rivestimento gelatinoso, può crescere affatto privo di tale rivestimento.

Sarebbe qui fuori proposito un'arida enumerazione delle ipertrofie della membrana cellulare riscontrate nei vari microrganismi, enumerazione che chiunque potrà trovare in opere speciali sull'argomento ⁴⁾.

Si possono formulare molte ipotesi sul significato di questi involucri mucogelatinosi. In alcuni casi queste membrane, per il loro peso specifico, possono permettere agli schizomiceti avidi di ossigeno di galleggiare alla superficie dei liquidi, come è il caso dei batteri acetificanti. Talora invece pare che esse servano loro di protezione dagli improvvisi cambiamenti di temperatura (*Leuconostoc e batteri del latte*) e dalle cause di rapido essiccamento e simili.

Le difficoltà di preparazione delle membrane batteriche e delle produzioni che ne dipendono, hanno dato luogo a lunghe controversie sulla loro costituzione chimica, costituzione anche oggi, tranne poche eccezioni, non del tutto chiarita. È certo tuttavia che bisogna rinunciare a considerare l'antica concezione che la membrana microbica sia sempre costituita dalla stessa cellulosa delle piante superiori. Mulder già aveva studiato la *madre dell'aceto* e Nägeli e Loew, trattandola con idrato sodico e acido cloridrico, separarono una sostanza solubile in reattivo cuproammoniacale, sostanza che idrolizzata dava luogo a zucchero. Nencki e Schaffer parlarono di una cellulosa delle sarcine e dei batteri della putrefazione.

La questione della natura cellulosa della membrana batterica è stata nuovamente ripresa in seguito agli studi di A. Brown sull'*A. xylinum*. Il Brown riteneva che la membrana dell'*A. xylinum* fosse formata da cellulosa mentre il Beijerinck la considerava costituita da sostanze amilacee e l'Emmerling da chitina. Quest'ultima ipotesi era basata sulla presunta insolubilità in reattivo cuproammoniacale, sul contenuto in azoto e sulla presenza di glucosamina fra i suoi prodotti di degradazione. Vedremo in seguito che gli studi recenti hanno invece confermato l'ipotesi di Brown.

Anche a proposito di altri schizomiceti, dei batteri della difterite e della tubercolosi (Aronson, Iwanoff), del batterio del fieno (Vandervelde), del *B. prodigiosus* (Nishimura) si hanno infinite discussioni se le membrane siano formate da chitina, da cellulosa, da emicellulosa e da pectine.

Noi ci limiteremo a parlare solo delle fermentazioni mucilaginose, poichè esse stanno in rapporto diretto con le sintesi che formano oggetto del presente lavoro. Anche per quanto riguarda i particolari di tali fermentazioni rimandiamo alla lettura di opere speciali e non tratteremo qui, che in modo possibilmente breve, della produzione di alcune sostanze gommose, osservate frequentemente, per opera di schizomiceti e di eumiceti. Tali sostanze gommose riceverono da Beijerinck ⁵⁾ il nome di glucosano, levulano, mannano, galattano, arabano, ecc. secondo che i loro prodotti di idrolisi danno origine a destroso, fruttosio, mannosio, galattosio, ecc.

Queste sostanze viscoso e gommose, che si trovano nel terreno di coltura, sono dovute, come abbiamo visto, alla formazione di involucri muciluginosi, che dalla cellula batterica passano nel substrato. Esse vengono dai batteriologi denominate gomme, benchè non rassomiglino dal punto di vista strutturale alle comuni gomme vegetali.

I componenti più frequenti di tali gomme sono il fruttosano o levulano, prodotto da microorganismi del tipo *Bacillus mesentericus* e *B. subtilis* e da altre specie similari.

Il levulano studiato esaurientemente da Hibbert e Tarr⁶) è un polimero del 2,6 anidro-fruttosio di tipo furanico, analogo alla inulina del carciofo (1,2 anidro-fruttosio).

Vi è un rapporto ben determinato fra il substrato ed il polisaccaride sintetizzato dal microorganismo. Ad esempio il *B. mesentericus* non agisce nè sul glucosio, nè sul galattosio, nè sul mannosio e neanche sul fruttosio normale (frutto-piranosio), ma solamente sul saccarosio dal quale si origina il fruttosio del tipo richiesto per tale sintesi batterica (frutto-furanosio). Esso agisce anche su altri polisaccaridi che contengono il frutto furanosio, ad esempio sul raffinoso. Altre specie affini quali il *B. vulgatus* ed il *B. megatherium* e la *Pseudomonas pruni* danno luogo alla formazione di levulano.

Varie specie del *Leuconostoc* producono glucano, che non fu studiato finora in modo esauriente, causa la resistenza presentata alla metilazione. Pare che anche in questo caso intercedano stretti rapporti fra la configurazione molecolare del substrato ed il polisaccaride. Tale sintesi avviene dal destroso del saccarosio, mentre il levuloso rimane invariato. Altri polisaccaridi, quali l'arabano e il galattano, non ben studiati finora, sono dovuti al metabolismo di schizomiceti poco noti, in parte fitopatogeni (*Bact. sacchari*, *Bact. acaciae*, ecc.).

Tralasciando per ora di parlare delle polimerizzazioni dovute all'A. *xylum* che formeranno oggetto della nostra trattazione, accenneremo ad altri polisaccaridi di tipo più complesso, ma meno studiati, quali sono quelli prodotti dai batteri delle leguminose (varie specie di *Rhizobium*). Questi polisaccaridi sembrano avere una composizione affine alle comuni gomme vegetali e contengono acidi uronici. Essi non hanno alcun rapporto con gli zuccheri del substrato, al contrario di quanto avveniva nei casi precedenti, ma possono dare luogo a prodotti sintetici, partendo da qualsiasi idrato di carbonio. Pare che questa attività sintetica sia in rapporto alla fissazione dell'azoto e che alcune razze di *Rhizobium* siano più attive delle altre. Finora all'analisi in questi prodotti di sintesi non furono riscontrati che il glucosio e l'acido glucuronico.

Anche i funghi formano spesso polisaccaridi che per idrolisi danno galattosio, mannosio, glucosio, idoso e altroso. Ad es. la *Fumago vagans* e altri funghi formano polisaccaridi dal glucosio. Il *Penicillium luteum* produce uno speciale acido luteico, che idrolizzato dà acido malonico e glucosio. Il *Penicillium Charlesii* coltivato su glucosio dà luogo ad acidi e polisaccaridi: un polimannosio ed un poligalattosio (mannocaroloso), il quale, studiato in questi ultimi anni, risulta essere formato da una catena di 8-9 mannosio. Il *Penicillium varians* sintetizza un polisaccaride complesso (varianosio), che per idrolisi dà galattosio, glucosio ed un altro esosio, formando catene di varie unità coi due mannosio.

Nel micelio dei funghi sono frequenti sostanze che furono considerate equivalenti a sostanze tipiche delle piante che furono denominate cellulosa di funghi, amido di funghi, ecc. La micologia è generalmente materia riservata ai botanici e quindi la trattazione chimica è sovente manche-

vole, per questo motivo le accennate analogie coi prodotti di sintesi delle piante sono spesso dovute a somiglianze superficiali, basate su colorazioni istologiche od a reazioni colorate, senza che l'identità sia stata ulteriormente stabilita. Non basta ad es. che un polisaccaride dia luogo ad una colorazione azzurra con iodio, perchè senz'altro saggio debba essere considerata come amido.

La parte solubile in acqua di taluni miceli, idrolizzata con acidi diluiti e fermenti dà origine a zuccheri, generalmente glucoso. Dal *Penicillium expansum* si ottiene il polisaccaride detto mixodestrano e dall'*Aspergillus niger* un mixogalattano. Con lo stesso *Aspergillus niger* si ottiene il così detto amido solubile, che pare essere un amilose.

I tessuti dei funghi trattati con alcali diluiti sono in parte solubili ed in parte insolubili. L'estratto solubile contiene idrati di carbonio, finora non ben definiti, mentre la parte insolubile consiste nella cosiddetta cellulosa di funghi o micocellulosa considerata da alcuni come cellulosa vera infiltrata da altre sostanze, e da alcuni come cellulosa modificata. Tale cellulosa è stata caratterizzata in base a reazioni colorate e raramente in seguito a preparazioni di derivati.

Norman ⁷⁾ parlando del derivato acetilico dice che quantunque la cellulosa dai funghi sia parzialmente acetilabile, il prodotto ottenuto non è solubile in cloroformio, come dovrebbe avvenire per la acetilcellulosa normale. Un'altra differenza è data dal fatto che la cellulosa dai funghi è completamente insolubile in soluzione cuproammoniacale. Essa è peraltro solubile in acido solforico 72 % a freddo, come pure è solubile quando essa venga trattata con solfuro di carbonio e idrato sodico. Anche la chitina contenuta nei tessuti dei funghi è diversa dalla chitina animale.

Negli ultimi decenni specialmente per opera dei ricercatori dell'Istituto Rockefeller la batteriologia ha ricevuto un nuovo impulso dalle ricerche chimiche sui polisaccaridi dei microrganismi e tali studi hanno validamente contribuito a chiarire alcune questioni ancora oscure nel campo delle immunità e della patogenesi delle infezioni. I microrganismi più studiati da questo punto di vista furono i pneumococchi: negli ultimi anni però le ricerche si estesero ad altri cocchi, a batteri e a funghi ⁸⁾.

In base a dati immunitari i pneumococchi furono distinti in 32 tipi. A ciascun tipo di pneumococco corrisponde un polisaccaride specifico, isolato dalle sue colture, che rappresenta un glucide o un suo derivato costituente la capsula del germe. A questo polisaccaride sarebbe da riferirsi la tipospecificità immunitaria del gruppo. Specialmente ben studiati furono i polisaccaridi del tipo I, II, III, IV. Essi hanno il peso molecolare molto elevato (1000-5000) e differiscono dal punto di vista immunitario, essendo attivi per sieri omologhi e inattivi per gli altri. Da ceppi di questi tre gruppi furono isolati composti di diverso potere rotatorio, che originano prodotti di idrolisi differenti: I, con il 5 % di azoto, è formato da acido galatturonico e aminoglucoso, mentre II e III sono privi di azoto e sono formati rispettivamente da glucoso e da glucoso e acido aldobionico.

Questi idrati di carbonio, anche in grandissime diluizioni (1 : 5.000.000), danno una precipitazione specifica coi sieri omologhi, ma non hanno funzione di antigene. Questa si ottiene copulando il polisaccaride con una pro-

teina, ad es. con siero di cavallo: si forma così un antigene sintetico, che iniettato nel coniglio dà un immunosiero specifico, eminentemente attivo per il polisaccaride da cui deriva.

Anche nei bacilli della tubercolosi furono riscontrati polisaccaridi dai quali si ottennero d-arabinoso, d-mannoso e d-galattoso ⁹⁾. Prima di lasciare questo argomento, vogliamo ancora brevemente accennare alla sintesi data dai microrganismi di polisaccaridi assai importanti, quali il glicogeno e l'amido.

Cremer ¹⁰⁾ trovò che l'estratto di lievito lasciato a riposo qualche tempo perdeva il suo glicogeno e che questo si produceva nuovamente se al succo veniva aggiunta una sufficiente quantità di zucchero. Henneberg ¹¹⁾ confermò questa osservazione su lieviti viventi e trovò che l'aggiunta del 20 % di saccarosio permetteva ai lieviti di accumulare grandi quantità di glicogeno. D'altra parte si era osservato che la quantità di anidride carbonica sviluppata dai lieviti era minore di quella equivalente all'idrato di carbonio scomparso e ciò perchè una parte dello zucchero si trasformava in polisaccaridi affini o identici al glicogeno. Il glicogeno viene consumato dai lieviti quando nei substrati non siano presenti altri idrati di carbonio. Molti autori hanno constatato che simili prodotti di condensazione dei monosi, che danno una colorazione rosso-bruna con iodio, sono formati dalle cellule di vari microrganismi in alcuni periodi della loro evoluzione.

In molti microrganismi, *Aspergilli*, *Penicilli*, ecc., fu osservata la presenza di sostanze simili all'amido che danno la caratteristica reazione con iodio. Boas constatò che in presenza di glucosio o di altri esosi o anche pentosi, l'*Aspergillus niger* produce sostanze simili all'amido e che questa sintesi è favorita da speciali condizioni sperimentali. Grey stabilì che il *Bacterium coli commune* nel suo metabolismo, in presenza di eccesso di idrati di carbonio forma delle sostanze amilacee.

La natura provvede in modo sobrio ed elegante alla formazione ed alla degradazione degli idrati di carbonio: le piante verdi sintetizzano in presenza della luce gli idrati di carbonio dall'anidride carbonica dell'atmosfera, i lieviti fermentano gli idrati di carbonio in alcool ed i batteri acetificanti ossidano l'alcool in acido acetico e successivamente in anidride carbonica.

La presenza di bacilli acetificanti in natura e la loro facile adattabilità sono causa di frequenti infezioni dei liquidi zuccherini e danno luogo alla acidificazione della birra, dei mosti e del vino.

Già nel 1822 Persoon aveva riconosciuto il carattere vegetale delle membrane che si formano alla superficie dei liquidi che acetificano e diede il nome di *Mycoderma* ai microrganismi che producono queste membrane. Nel 1837-38 Turpin e Kützing ¹²⁾ formulavano l'ipotesi che la fermentazione acetica fosse causata da microrganismi e Kützing diede una descrizione di questi per i quali propose il nome di *Ulvina aceti*.

Nel 1864 Pasteur in una memoria sulla fermentazione acetica ¹³⁾ in op-

posizione all'ipotesi meccanico-chimica, strenuamente difesa da Liebig, dimostrò che ogni qual volta un liquido dà luogo alla fermentazione acetica, presenta alla sua superficie un microrganismo organizzato, e che in mancanza di esso ogni formazione di aceto è impossibile. Pasteur descrisse questi microrganismi, che si presentano riuniti in catene, i cui elementi, di diametro variabile (media $1,5 \mu$) e di lunghezza di circa 3μ , sono generalmente strozzati nella loro metà. Ad essi diede il nome di *Mycoderma aceti*. Chi desiderasse conoscere queste magistrali ricerche e le eleganti descrizioni di Pasteur, potrà leggere la memoria originale ed il capitolo relativo nel trattato classico di Duclaux ¹⁴).

La natura microbica del processo di acetificazione, già intravveduta, come si è visto, da altri autori, fu definitivamente dimostrata da Pasteur, il quale accertò che bastava esporre all'aria un miscuglio di vino e aceto, allungato con acqua, per determinare la comparsa di un velo sottile, fragile e di aspetto vellutato, che col tempo diventa più rugoso e resistente, costituito da vegetazioni del *Mycoderma aceti*.

Nel suo lavoro Pasteur trattò il problema dal solo punto di vista biologico e non si preoccupò della questione di specie. Solo in seguito ci si avvide che numerose specie di microrganismi possono dare luogo alla acetificazione e questi differiscono morfologicamente gli uni dagli altri, sia nell'aspetto sia nella forma della loro membrana, sia nella velocità del processo di acetificazione, nel rendimento, ecc.

Nel 1879 Hansen, applicando per la prima volta a questo problema il metodo delle colture pure, stabilì l'esistenza di due nuove specie, al tutto simili fra loro, che si differenziano per il loro comportamento di fronte allo iodio, che colora l'una in azzurro, l'altra in giallo. Esse sono l'*A. pasteurianum* e l'*A. aceti*.

Nel 1886 A. Brown, studiando la madre dell'aceto, purificata col metodo del frazionamento e della diluizione, isolò un'altra specie acetificante, caratterizzata dalla formazione di membrane gelatinose e resistenti, alla quale diede il nome di *Bacterium xylinum*.

Infine nel 1897-98 Henneberg studiò e definì nuove specie acetificanti: *A. oxydans*, *acetigenum*, *industrium* ed *ascendens*; l'enumerazione potrebbe continuare con le specie descritte da Beijerinck, Peters, Lindner, Lafar ed altri. I caratteri differenziali di questi microorganismi e di alcuni di quelli, ai quali abbiamo accennato, sono spesso incerti e di difficile descrizione. Essi sono quasi esclusivamente rappresentati da leggere differenze morfologiche e dal diverso aspetto delle membrane, ma entrambi questi caratteri sono spesso variabili e mal definiti. L'aspetto delle membrane, la loro colorazione con lo iodio sono talora modificati dalle condizioni dell'ambiente e anche i caratteri biologici dei vari microrganismi non risultano costanti nelle ricerche dei vari autori, a causa forse della diversa composizione dei substrati. I terreni di coltura solidi, che potrebbero giovare allo studio del problema, a poco servono nel caso dei batteri acetificanti, perchè essi danno luogo a banali patine mucose, di colore bianco, poco caratteristiche.

Quanto abbiamo finora detto non incoraggia gli studiosi ad una classificazione dei batteri acetificanti e i dati che noi possediamo ci forniscono

Arabinoso	Bct. industrium	Bct. oxydans	Termobacter. aceti	Bct. aceti	Bct. acetosum	Bct. Künzingianum	Bct. Pasteurianum	Bct. acetigenum	Bct. ascendens	Bct. Schützenbachii	Bct. curvum	Bct. orleanense	Bct. xylinoides	Bct. xylinum	Bct. vini acetati
Levuloso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Destroso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Galattoso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Sorboso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Saccaroso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Maltoso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Lattoso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Raffinoso	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Destrina	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Amido	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Glicogeno	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Inulina	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Alcool metilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» etilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» propilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» isopropilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» butilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» isobutilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» amilico	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Glicole etilenica	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Glicerina	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Eritrite	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Mannite	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Dulcite	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++

	Formazione di membrana	risale sulle pareti	colorazione con iodio	intorbidamento del liquido	forme cellulari ipertroiche	Mobilità	TEMPERATURA		Quantità di alcool che ancora permette lo sviluppo	Quantità di acido acetico
							optimum	massima		
1) <i>B. oxydans</i> <i>B. industrium</i>	tenui spessa	++ —	— —	+++ +++	++ ++	++ ++	18-21 23	30-33 35	7 6-7	ca. 2 2,7
2) <i>B. aceti</i> <i>B. pasteurianum</i> <i>B. kützingianum</i> <i>B. acetosum</i> <i>B. rancens</i>	abbast. spessa asciutta, incre- spata abbast. sottile simile ai lieviti asciutta, incre- spata	— ++ poco ++	— ++ — —	— ++ ++ poco	+ frecuen rare +	— — — ++	34 34 34 28	42 42 42 36	11 9,5 9,5 11	6,6 6,2 6,6 6,6
<i>Termobacter aceti</i>	molto tenue	++	—	+++	++	++	—	—	9	6
3) <i>B. xylooides</i> <i>B. orleanense</i> <i>B. xylinum</i> <i>B. ascendens</i>	varie forme robusta spessa, tenace tenue, uniforme	— — ++	+ + —	— — +++	— + frecuen	— — —	28 30 26-33 31	35 35-36 34 44	— — 6-7 12	— — 4,5 9
4) <i>B. acetigenum</i> <i>B. Schützenbachii</i> <i>B. curvum</i>	sottile, resistente scarsa, poco re- sistente scarsa, poco re- sistente	— — —	+ — —	+ + +	rare — —	+	33 25-27 30	— 31-35 ca. 38	7 — —	3,5 11,5 —

1) batteri del mosto di birra - 2) batteri della birra - 3) batteri del vino - 4) batteri a fermentazione rapida.

appena elementi sufficienti per la determinazione in grandi gruppi. Malgrado ciò, Beijerinck, Rothenbach ed Henneberg cercano di risolvere tale problema, ma le discussioni fra loro avvenute dimostrano una volta ancora la difficoltà della questione. Tralasciamo di parlare della classificazione di Beijerinck ¹⁵⁾ e di Rothenbach, accenneremo brevemente solo a quella di Henneberg ¹⁶⁾ che è anche quella adottata da Jörgensen e Hansen nel loro recentissimo libro ¹⁷⁾. Questa classificazione è basata su caratteri fisiologici e su considerazioni di indole pratica e industriale. Essa comprende:

1) Schnellleisigbakterien, batteri a fermentazione rapida del processo di Schützenbach, che danno raramente luogo a formazione di zooglee. Essi comprendono l'*A. acetigenus*, l'*A. Schützenbachii* e l'*A. curvum*.

2) I batteri della birra, al quale gruppo appartengono l'*A. aceti* e il *Termobact. aceti*, isolati dalla birra a bassa fermentazione, l'*A. pasteurianum*, l'*A. kützingianum* e l'*A. acetosum*, isolati dalla birra ad alta fermentazione.

3) I batteri del mosto di birra: *A. oxydans*, *A. industrium*.

4) I batteri del vino: *A. xylinum*, *A. xylinoides*, *A. orleanense* e l'*A. Ascendens*.

Wisserx' Hoff ¹⁸⁾ in un recente lavoro sul genere *Acetobacter*, pur non nascondendo la necessità di ulteriori ricerche morfologiche e culturali, ha proposto una classificazione puramente fisiologica delle specie dell'*Acetobacter*. Tale classificazione rappresenta un progresso sulle precedenti ed è riprodotta nel classico manuale del Bergey ¹⁹⁾.

Noi ci limiteremo a riepilogare i comuni caratteri morfologici e culturali dell'*Acetobacter* nella precedente tabella di Jörgensen, pag. 85 ²⁰⁾. Ci pare interessante ancora richiamare alcuni dati di acetificazione dei batteri dell'aceto, dati che possono servire a caratterizzarli. L'*A. vini-acetati* (Henneberg) è generalmente molto acetificante, mentre l'*A. xylinum* è relativamente poco acetificante. Si è tuttavia osservato in alcuni casi una ossidazione successiva, e ciò avviene ad es. per il glucosio con l'*A. xylinum* e l'*A. xylinoides*; quest'ultimo dà luogo a ossidazioni successive del saccarosio e della glicerina. L'*A. vini-acetati* acidifica molto il levuloso, il galattosio, il raffinoso. L'*A. curvum*, l'*A. orleanense* acetificano bene anche la destrina. Tutti i batteri acetificanti ossidano l'acool propilico, e l'*A. Schützenbachii*, l'*A. orleanense* e l'*A. vini-acetati* anche la glicerina.

Queste ricerche furono fatte con estratti di lievito al quale venivano aggiunti i rispettivi zuccheri (2-3%) e alcoli. Molti di questi microrganismi danno luogo alla formazione di acido ossalico.

Henneberg riassume nella tabella a pag. 86 questi caratteri differenziali ²¹⁾.

L'acetificazione dei liquidi alcoolici è un caso tipico di fermentazione ossidativa ed è dagli enzimologi studiata con particolare predilezione quale conferma delle moderne teorie di Wieland ²²⁾.

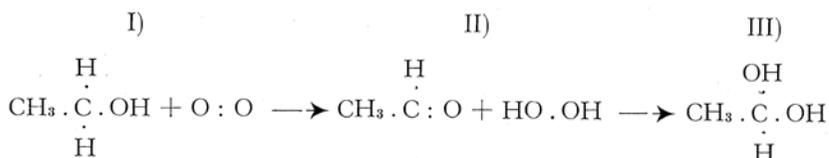
Come è noto, per il Wieland l'azione dei fermenti, che intervengono come acceleratori nelle ossidazioni biologiche, è di favorire una deidrogenazione, rendendo l'idrogeno suscettibile di entrare in reazione con l'ossi-

gena molecolare. Un modello di tale reazione è la ossidazione catalitica dell'alcool in aldeide per mezzo del nero di platino.

Al contrario di quanto avverrebbe secondo l'ipotesi del Warbourg in questo caso non è l'ossigeno che viene attivato, ma bensì l'idrogeno dell'alcool, che quindi si può unire all'ossigeno molecolare. Che l'ossigenazione non sia necessaria, è provata dal fatto che la reazione avviene anche in assenza di ossigeno, purchè esista un accettore di idrogeno (chinone o bleu di metilene).

Nella fermentazione acetica l'alcool viene dapprima ossidato in aldeide acetica e questa ad acido acetico. Nella pratica dell'acetificazione, in cattive condizioni di fermentazione, si possono formare quantità notevoli di aldeide acetica, che si può separare trattando con solfiti. Nella trasformazione dell'alcool in aldeide acetica, si tratta di una deidrogenazione: la successiva trasformazione dell'aldeide (del suo idrato) in acido acetico è anche essa una deidrogenazione. La fermentazione acetica si può quindi formulare nei modi seguenti.

In condizioni aerobiche, partendo dall'alcool, si passa all'aldeide ed al suo idrato:



che a sua volta si trasforma in acido acetico:

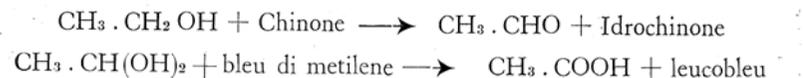


In condizioni anaerobiche, una molecola di aldeide idrata reagisce con una molecola di aldeide dando origine ad acido acetico e a nuovo alcool:



In questo caso è l'aldeide acetica che funziona da accettore di idrogeno. L'acqua ossigenata formatasi nel primo schema è scissa in acqua e ossigeno da una catalasi.

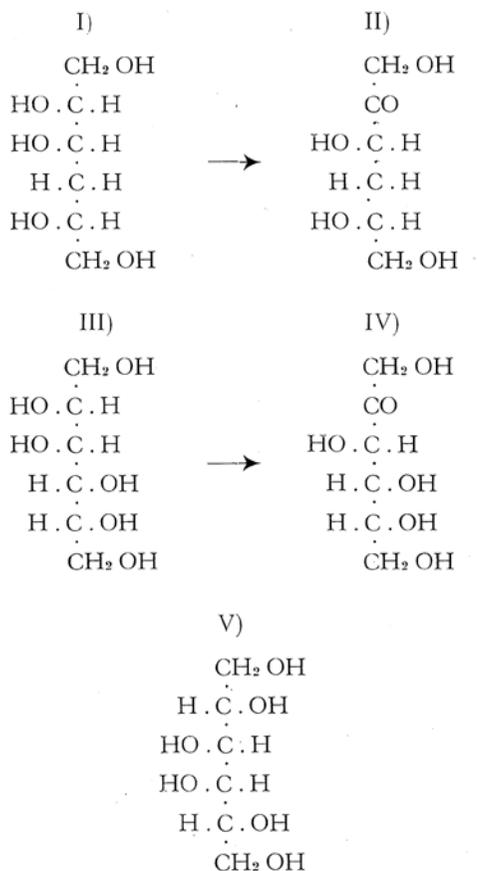
Invece dell'ossigeno o dell'aldeide acetica possono prendere parte alla deidrogenazione sostanze estranee, come accettori di idrogeno [---] mente violetto di metilene e chinone.



Oltre alla fermentazione acetica importanti sono le ossidazioni, date dalle varie specie di batteri acetificanti, degli zuccheri e degli alcoli corrispondenti e le ulteriori ossidazioni di essi: noi le passeremo brevemente in rassegna nell'ordine seguente:

- a) ossidazioni degli alcoli a zuccheri;
- b) ossidazioni degli zuccheri ai loro acido-derivati;
- c) successive ossidazioni di questi acidi.

a) La trasformazione degli alcoli a zuccheri ubbidisce ad alcune norme, note col nome di *regola di Bertrand*. Non tutti gli alcoli si trasformano in chetasi, ciò avviene solo per quelli che soddisfano ad alcune



condizioni stereochimiche. Secondo Bertrand l'ossidazione avviene quando il gruppo ossidrilico da ossidare sia vicino ad un secondo gruppo ossidrilico in posizione *cis*, quindi la sorbite passa a sorboso (I, II), la mannite a levuloso, mentre la dulcite (V) non viene ossidata:

Furono osservate alcune deviazioni da questo schema, dipendenti da peculiarità del substrato.

Nulla si conosce sperimentalmente sul chimismo e l'enzimologia di queste ossidazioni. Probabilmente anche qui si verifica una deidrogenazione di questo tipo:



Il glicole etilenico passa ad acido glicolico in presenza dell'*A. aceti*, *A. suboxydans*, *A. xylinum* e *A. melanogenum*.



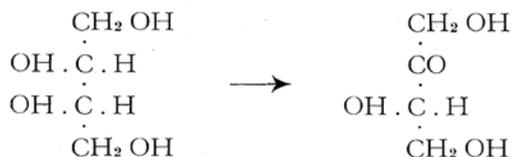
Analogamente il glicole propilenico ed il glicole 2, 3 butilenico in presenza di *A. xylinum* e di *A. suboxydans* si ossidano rispettivamente ad acetolo ed a acetoina (dimetilchetoso).



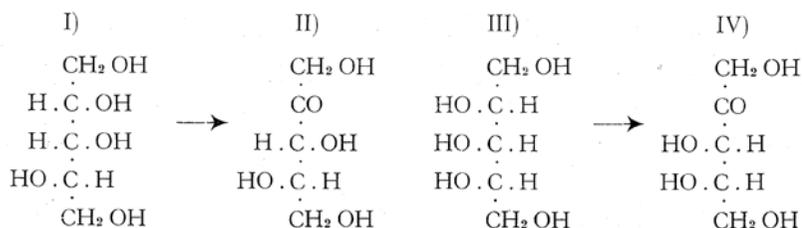
La glicerina viene ossidata a diossiacetone per opera dell'*A. xylinum*, *A. suboxydans*, ed altri batteri del gruppo.



L'acool a 4 atomi di carbonio, eritrite, viene ossidato a chetoso (1-eritruoso) per azione dei microrganismi precedenti:



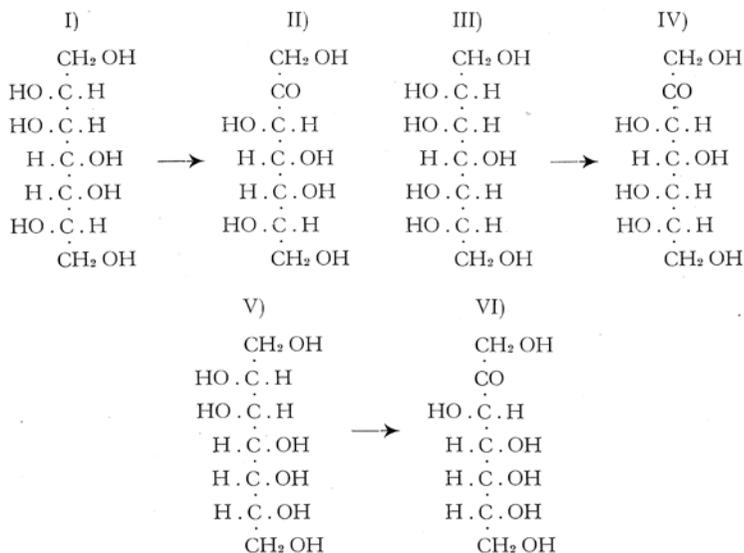
Dei composti a 5 atomi di carbonio, l'arabite (I) e l'adenite (III) si trasformano nei rispettivi chetopentosi: xylochetoso (II) e adonoso (IV). Il primo di questi era già stato studiato da Bertrand mentre il secondo venne solo ottenuto recentemente:



La sorbite che è stata oggetto delle classiche ricerche di Bertrand, dà luogo alla formazione di sorboso, per azione di un bacillo acidificante che egli denominò bacillo del sorboso e che poi si dimostrò essere l'*A. xylinum*.

Analogamente la mannite passa a fruttosio, mentre la dulcite e l'idite, a causa della loro costituzione, non reagiscono in presenza dell'*A. xylinum*.

Gli alcoli a 7 atomi di carbonio si ossidano nei rispettivi chetosi: la perseite passa a perseuloso (I, II), la a-d-glucoeptite a 1-glucoeptuloso (III, IV) e la volemite a sedoeptuloso (V, VI).



Anche dal a, b, d-glucoctite si ottenne un chetoctoso.

Incerta invece è la formazione degli aldosi dei rispettivi alcoli. Hermann e Neuschul ottennero mannoso dalla mannite e galattoso dalla dulcite con *A. kützingianum* e *A. gluconicum*, però tali risultati attendono ulteriore conferma.

b) Già prima degli studi esatti sulla morfologia dei bacilli acetificanti, Boutroux nel 1880 aveva osservato la formazione di acido gluconico dal glucoso per azione dei germi dell'aceto. In seguito questa azione fu confermata e si avvide che essa era dovuta all'*A. aceti*, *A. xylinum*, *A. Kützingianum*, *A. pasteurianum*, e ad altri molti microrganismi dell'aceto.

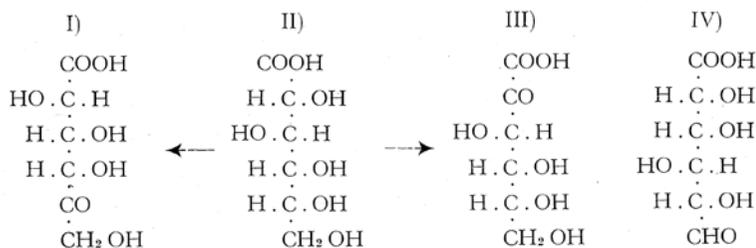
Recentemente fu isolato l'*A. gluconicum* dal *Kombucha* ¹⁾ e nuove

1) *Kombucha*: è una bevanda usata in Cina, che si prepara trattando the zuccherato con batteri acetificanti.

specie di bacilli acidificanti dal *Hoshigaki* ¹⁾ che danno un rendimento quasi quantitativo in acido gluconico. Però questo importante prodotto terapeutico, del quale in america si producono 250.000 kg. annui, si ottiene industrialmente con l'*Aspergillus niger* e con l'*A. chrysogenum*.

Altri aldosi vengono ossidati nei rispettivi acidi: d-mannoso in acido d-mannonico per mezzo dell'*A. gluconicum*, il d-galattoso in acido d-galattosico con vari batteri del gruppo, e l-arabinoso e l-xiloso in acido l-arabonico e acido l-xilonico per opera dell'*A. xylinum* ed altri.

c) L'ossidazione successiva dell'acido gluconico (II) può avvenire in tre modi differenti, in dipendenza della posizione dell'ossidile ossidato. Da lungo tempo era nota la formazione di acido d-5-chetogluconico (I) per azione dell'*A. xylinum* e altri germi dell'aceto, mentre solo recentemente si ottenne l'acido d-2-chetogluconico (III) dal gluconato di calcio per mezzo dell'*A. suboxydans* e un altro prodotto di ossidazione, l'acido aldeidgluconico (IV), che si ottiene con speciali razze dell'*A. industrium* var. *Hoshigaki*.



L'acido d-mannonico con *A. suboxydans* forma l'acido 2-chetogluconico. Dal d-fruttosio, secondo Hermann e Neuschul, per opera dell'*A. gluconicum* si otterrebbe acido chetogluconico, ma i risultati attendono ancora conferma. Anche l-sorboso darebbe luogo alla formazione di piccole quantità di acidi riducenti.

Dal d-fruttosio per opera di speciali bacilli acidificanti si ottengono quantità notevoli di acido *Koji* (cogico) ²⁾ il quale però generalmente si ha per azione di aspergilli (*A. orizae*, *A. glaucus*) dal d-glucosio, saccarosio, fruttosio, inulina, amido, ecc.

Fu Adrian J. Brown ²³⁾ che nel 1886 in una sua memoria « sul fermento acetico che forma la cellulosa » isolò e descrisse l'*A. xylinum*.

Egli ottenne il microorganismo in colture pure partendo dalla madre dell'aceto e procedendo col metodo della diluizione, analogamente a quanto aveva fatto nei suoi lavori precedenti.

1) *Hoshigaki*: i batteri dell'Hoshigaki furono isolati dal malto fermentato preparato coi frutti di *Diospyros Kaki* (in giapponese = Hoshigaki).

2) *Koji*: è una sostanza che si ottiene dal riso nella preparazione del Saké o birra giapponese.

Riteniamo interessante per la trattazione del nostro tema riferire per esteso i particolari sperimentali di questa classica memoria.

Il terreno di coltura usato era composto di vino rosso diluito a metà con acqua e reso acido con acido acetico all'1% sotto forma di aceto comune. Questo terreno favorisce la coltura di tutti i batteri acetificanti ed arresta lo sviluppo di altri microrganismi.

Per definire meglio la purezza delle colture furono fatti trasporti su gelatina e mosto di birra. In dieci giorni circa su questi terreni cominciano a svilupparsi colonie distinte che trasportate in mezzi liquidi, danno origine a formazione di membrane.

Quando queste si sviluppano in liquidi di coltura adatti, si osserva dapprima una massa traslucida simile a gelatina alla superficie del liquido. L'accrescimento è rapido e tutto il liquido si copre di una membrana che in condizioni propizie può raggiungere uno spessore fino a 25 mm. Per agitazione del recipiente, la membrana, leggermente più pesante dell'acqua, si ricopre di liquido e sulla sua superficie si inizia la formazione di una seconda membrana: possono attenersi successivamente 5-6 strati. La membrana è bianca, traslucida e, se il liquido è colorato, essa assume talora il colore di questo.

Quando la *madre dell'aceto* si coltiva su mezzi non adatti ad es. acqua di lievito, si osserva dapprima una leggera pellicola al fondo del recipiente che a poco a poco lo riempie. Quando il microbo cresce su gelatina addizionata a malto si formano colonie sferiche, le quali si riuniscono in membrana. Questi batteri non liquefano la gelatina.

Nelle colture pure dell'*A. aceti* si forma una zooglea molto delicata e fragile, che per la sua resistenza molto minore differisce dalla tenace membrana dell'*A. xylinum*. Il comportamento chimico delle due specie di membrana è pure assai diverso.

Una soluzione di potassa a freddo disintegra completamente la zooglea dell'*A. aceti*, mentre la membrana dell'*A. xylinum* resiste più ore alla ebollizione con idrato di sodio. Trattando la membrana di *A. aceti* con acido solforico concentrato addizionato a iodio non si ha colorazione, mentre quella dell'*A. xylinum* dà una colorazione azzurra intensa; analoga reazione è data dallo iodio sciolto in cloruro di zinco. Brown pensa di conseguenza che queste due membrane siano dovute a due specie distinte.

La *madre dell'aceto* esaminata al microscopio appare formata da una inclusione di batteri più o meno allineati, in una membrana trasparente.

Questi batteri, di 2 μ di lunghezza, sono spesso riuniti fra di loro in catene. La colorazione con violetto di anilina (malveina) dimostra i batteri ben distinti, mentre la membrana rimane incolore. In vecchie colture si osservano forme arrotondate, come di cocchi, di 0,5 μ di diametro. Alcune volte nelle colture si trovano germi di 10-30 μ di lunghezza. A temperatura di 28°, si ha l'optimum di sviluppo: a 36° non si osserva più sviluppo, ma il batterio si conserva vivente. (continua)

Lo studio della microflora terricola insediatasi sulle lave vesuviane del 1895 -1899

S. Riccardo

(Ricevuto il 12 aprile 1942-XX)

(Primo contributo)

Le specialissime condizioni in cui viene a trovarsi chi risiede nelle amene piaghe vesuviane — potendo disporre di un non comune campo di osservazioni costituito dalle pendici di un vulcano in piena attività — avevano già richiamato vari anni or sono (1-5) l'attenzione di questo Istituto per cercare di determinare l'esistenza o meno di una successione microbiologica nell'impianto delle principali specie interessanti la fertilità di un terreno agrario.

Poter seguire per molti anni tale successione sopra un substrato naturale, sicuramente sterile al momento della sua solidificazione (figg. 1 e 2), facendo esperienze *in situ*, in zone più o meno lontane da terreni coltivati, rappresenta certo uno dei casi più perfetti per il batteriologo agrario, ed il Vesuvio, colle sue frequenti eruzioni, permette di studiare sia il naturale ripopolamento delle lave, sia la macro e microflora provocata su di esse dalla mano dell'uomo.

« Ci sono delle località sul Vesuvio — scriveva Rossi (6) — in cui il contrasto fra la morte e la vita è affascinante e il Gran Cono lavico, brullo, scosceso, franante, su cui letteralmente non vegeta coll'espressione di Giacomo Leopardi *arbor nè fiore*, spicca assai spesso, gigante scheletrico, vicino ai verdi e profondi boschi del Somma o alle superbe pinete dell'incantevole declivio fra Sebeto e Sarno: mentre per chi ascende il Somma dal lato di S. Anastasia, lo spettacolo improvviso che si ha, uscendo dai boschi, dell'Atrio del Cavallo e della Valle dell'Inferno, su cui domina tragico il Gran Cono, nella sua dantesca apparenza, ci trasporta in un mondo che ha dell'irreale e in cui la vita è assente. Tutta la storia del Vesuvio è piena di questi contrasti di vita e di morte ».

Le prime osservazioni compiute venti anni or sono non potevano essere che orientative, limitate a quello che permetteva la tecnica batteriologica di allora, la quale era ben lungi dall'incoraggiare simili studi con speranza di risultati molto utili.

Impossibile sarebbe stato, anche, sorprendere i primi albori della flora microscopica perchè, pur avendo il Vesuvio (dopo un periodo di calma assoluta che durò dal 1906 al 1913) ripreso lentamente la sua attività, la stazione del cratere nell'interno del cono non rendeva agevole prelevare dei campioni di lave recentissime, ed anche se ciò fosse stato

possibile, la permanenza delle lave nell'interno del cono ne avrebbe menomato assai il valore rispetto a un'invasione microbiologica. Per tali ragioni nelle prime esperienze, piuttosto che ricercare solamente ed obiettivamente le singole specie presenti, si cercò di dare la precedenza allo studio di uno dei processi microbiologici fra quelli ritenuti più importanti in ogni terreno, e precisamente s'incominciò col determinare la distribuzione degli azotofissatori nei terreni vesuviani di varia altitudine, concludendo che, mentre nei terreni agrari vesuviani inferiori ai 300 m. di altezza, i fissatori di azoto anaerobici, tipo *B. amylobacter*, sono sempre presenti, già ad una altezza superiore, almeno in alcune stagioni dell'anno, possono essere assenti.



Fig. I. - Lave che poco alla volta si ricoprono di vegetazione spontanea.

Presenti dichiarammo anche, o assenti parallelamente agli anaerobici, gli azotofissatori aerobici, tipo *Azotobacter*. In quanto a questi ultimi, fu merito del nostro Istituto averli isolati e studiati per primo nel Mezzogiorno d'Italia. In un nostro contributo del 1924 (4), mercè uno studio accurato morfo-biologico seguito su portaoggetti riscaldabile del Pfeiffer, partendo da colture monocitogenetiche, mettemmo anche in rilievo l'assenza di un accentuato polimorfismo dell'*Azotobacter chroococcum* Beij.,

come fino allora avevano preteso Löhnis e Smith (7-8). E, a convalidare il nostro asserto, intervenne due anni dopo, nel 1926, la memoria di Winogradsky (9), il quale, a proposito del pleomorfismo eccessivo attribuito dai suddetti autori agli azotobatteri, così si esprimeva:

« Il est curieux que ce fait banal, mal compris, ait été le point de départ d'une théorie extravagante, dénuée de tout fondement expérimental, selon laquelle l'Azotobacter, et à sa suite les espèces bactériennes en général, passeraient par un cycle évolutif extrêmement compliqué, comprenant une variété de formes bacillaires, filamenteuses, sporogènes, et plusieurs autres encore insoupçonnées ».



Fig. 2. - Lave sterili, lapillo, cenere e... *Spartium junceum*.

Abbiamo detto che le nostre prime osservazioni di venti anni or sono furono limitate a quanto la tecnica batteriologica di allora poteva offrirci. Infatti, solo nel 1925, incominciò l'alba di una nuova era nello studio microbiologico del terreno agrario coi magistrali lavori di Sergio Winogradsky (10-22) il quale, tenendo conto anche delle osservazioni di Conn (23) sull'uso dei colori acidi (*) per l'esame microscopico diretto del suo-

lo, creò tutta una nuova tecnica che, se pur non ha ancora dato tutti quei risultati che il microbiologo pedologo vorrebbe presto raggiungere, ha dato indubbiamente un forte impulso ad una nuova concezione di studi. E i risultati finora ottenuti non sono stati certo trascurabili! Una numerosa schiera di studiosi ha cercato, in questi ultimi quindici anni, di perfezionare sempre più tali metodi di studio, tendenti non solo ad avvicinarci il più possibilmente, nella sperimentazione, alle condizioni di vita dei microrganismi nel terreno agrario, ma anche ad osservare direttamente al microscopio tutta la microflora e microfauna terricola nel suo ambiente naturale, determinandone perfino il numero, e, possibilmente, le specie.

In tal senso hanno sperimentato Conn (24-29), Rossi e Riccardo (30-32), Riccardo (33-34), Koffman (35-37), Cholodny (38), Jadwiga Ziemiecka (39-41), Dianowa e Woroschilowa (42), Demeter (43-44), Kubiena (45-48), Jensen (49), Rossi e Gesuè (50), Rossi e Wang Tsu-Kao (51), Wang Tsu-Kao e Chih-San Chia (52), Stille (53), Starkey (54), Winnik e Goldberg (55), Waksman, Cordon e Hulpoi (56), e molti altri.

In merito alle osservazioni compiute dai vari Autori, meritano una particolare attenzione quelle di Dianowa e Woroschilowa, che, avendo isolato da terreni coltivati alcune specie batteriche morfologicamente assai vicine all'*Azotobacter*, ma sprovviste di potere azotofissatore, richiamano l'attenzione dei microbiologi agrari a non essere tratti in inganno dal semplice esame microscopico diretto nello studio qualitativo e quantitativo degli azotobatteri.

Kubiena mette, inoltre, in particolare rilievo l'uso dei metodi « micro-pedologici » raccomandando, per l'osservazione, il cosiddetto « microscopio da terreno » fatto costruire su designazione dell'autore dalla Ditta Reichert di Vienna.

« Da die Plattenmethode - conclude Kubiena - imstandè ist, einen «Grossteil aller im Boden (entwickelt und unentwickelt) vorhandenen «Organismenarten in einem einzigen bequemen Arbeitsgange zu bestimmen, wird sie stets ein unentbehrliches Hilfsmittel im Dienste der mikro-«biologischen Bodenuntersuchung bleiben. Die direkten Methoden treten «ihr indes als ein heute bereits unerlässliches Ergänzungsverfahren zur «Seite ».

In ciò siamo perfettamente d'accordo con Kubiena, perchè se il metodo classico delle piastre rappresenta un comodo sistema per poter isolare e studiare gran parte delle specie microbiche esistenti nel terreno, non si può fare a meno dei metodi diretti (complementari dei primi) e di altri metodi che ci avvicinino il più possibilmente alle condizioni naturali, per poter studiare quei microrganismi che o non si sviluppano affatto o modificano sensibilmente i loro caratteri morfo-biologici nei substrati agarizzati finora adoperati.

*) E' noto come i colori acidi, pur differenziando bene le forme vegetative, non esercitino alcun effetto sulle spore e sulle sostanze colloidalì del terreno. E' già questo un notevole risultato permettendo di poter constatare la presenza di microrganismi nel loro stato di piena attività, che è quello che interessa maggiormente. Le spore non rappresentano che facoltà potenziali, di cui si terrà il debito conto in determinate esperienze.

La vegetazione sulle lave del 1895-99.

La località da noi presa in esame nel presente contributo è stata la zona bassa del Colle Umberto, il quale sorse coll'eruzione del 1895-99. Questo Colle (che ha soli 42-46 anni di vita, poco distante dal Colle Canterani dove travasi l'Osservatorio, ed alto m. 888 sul livello del mare) ebbe la sua superficie interamente coperta dai prodotti dell'eruzione del 1906 e soprattutto dalla cenere, che in parte venne trasportata dal vento e dall'acqua, ed in parte andò a colmare le minime anfrattuosità della lava facilitando in tal modo lo sviluppo delle piante inferiori e superiori che erano andate perdute.

Molti licheni ricoprono larghe zone di roccia messa a nudo dalle precipitazioni atmosferiche. Secondo Comes (57) la forma alveolata e scoriacea delle lave affretterebbe lo sviluppo dei licheni, perchè tale stato della superficie della roccia rende più lunga la permanenza dell'acqua su di essa, agevolando così la moltiplicazione delle alghe unicellulari e la formazione dei licheni. Licopoli (58) riferisce che « le alghe e i licheni si contendono la priorità ». Fra i licheni, quello che è maggiormente diffuso e che si mostra per primo, è il lichene cespitoso, cioè lo *Stereocaulum vesuvianum* Pers. (*S. botryosum* var. *vesuvianum*, Ach.) di colore cinereo, alto qualche centimetro. Secondo Comes, sulle lave eruttate da qualche anno non è possibile rinvenire alcuna traccia di vegetazione, all'infuori di uno scarso accenno di Alghe unicellulari, non escluse le Diatomee. La vegetazione lichenica si presenterebbe più tardi, e, secondo lo stesso Licopoli, verso il settimo anno dell'età della lava. Lo sviluppo più o meno rapido di tal lichene dipenderebbe inoltre dallo stato relativo della levigazione o della anfrattuosità della superficie lavica, ed anche dal grado di compattezza e di decomposizione della roccia.

Sul Colle Umberto, però, oltre ai Licheni, che a dozzine di specie popolano e adornano le lave, ai Muschi (*Bryum*, *Phascum*, *Grimmia*, *Bartramia* e tanti altri che formano zolle e cotenne più o meno fitte), alle Epatiche (*Jungermannia compacta* e *J. complanata*, le quali, col loro esteso sviluppo, oltre ad aumentare la superficie inerbata, fissano il detrito lavico già formato impedendo il dilavamento della roccia colle precipitazioni atmosferiche), si riscontrano, specie nelle cripte ombrose ed umide, la piccolissima Felce denominata *Cymnogramme leptophylla*, l'*Adiantum Capillus Veneris*, altre Felci più rustiche e meno esigenti di ombra (*Cheilanthes odora*, *Ceterach officinarum*, *Polypodium vulgare*, *Asplenium Tricomane*, *A. Adiantum nigrum*), nonchè molte Fanerogame, che rinverdono soprattutto i punti più soleggiati. Numerose sono le piante di *Centranthus ruber*, di *Sedum rufescens*, di *Scrophularia canina*, di *Helichrysum litoreum*, di *Rumex bucephalophorus*, di *Reseda fruticulosa*, ecc.

Nè mancano esemplari di Graminacee, rappresentati dalla *Poa bulbosa*, dall'*Aira Cupuniana*, dal *Corynephorus articulatus*, dalle *Festuca ciliata* e *F. bromoides*, dall'*Hordeum leporinum*, dalla *Poa annua*, dal *Phleum Micheli*, dal *Triticum repens*, dall'*Andropogon hirtum*, ecc...

Fra le piante legnosette e legnose, in primo luogo è da ricordare lo *Spartium junceum* (la ginestra odorata contenta dei deserti), e poi la Ro-

binia Pseudo-Acacia, il *Populus alba*, l'*Alnus cordata*, e molti esemplari di *Pinus Pinea* e di *Pinus nigricans*, che la Milizia Forestale da vari anni, con encomiabile fervore, sta collocando a dimora un po' dappertutto sulle pendici del Vesuvio, e di cui molti esemplari sono già bene sviluppati ed alti oltre due metri.

I metodi seguiti per lo studio dei microrganismi anabolici e catabolici.

Lo studio delle varie categorie microbiche fu esteso, oltre che ai microrganismi anabolici (fissatori d'azoto e nitrificanti) e ai catabolici (denitrificanti, putrefacenti, degradatori della cellulosa), anche alla eventuale presenza di invisibili o ultramicroscopici.

In quanto alla tecnica seguita abbiamo tenuto conto dei recenti contributi dei vari Autori, tendenti a completare e perfezionare i primi metodi di Conn e di Winogradsky.

Per lo studio dei fissatori di azoto, oltre alle piastre di silico-gel usate da Winogradsky, si è adoperato il metodo per diluizione di Hiltner e Störmer (59), che per gli azotofissatori (sia aerobici che anaerobici) risponde benissimo, data la facilità con cui questi microrganismi possono svelarsi in appropriati substrati elettivi. Infatti, la soluzione di Beijerinck, distribuita in tubi e insemata con diluizioni progressive di terreno, dopo un mese a 28° C. in presenza di azotobatteri, dà sempre il tipico anello formato dal pigmento brunastro fino a nero, sulle pareti del vetro, in corrispondenza della superficie del liquido. E l'esame microscopico dà la piena conferma che si tratti dell'*Azotobacter*, come anche le determinazioni chimiche col Kjeldahl (fatte colle stesse soluzioni, prive di azoto combinato, e distribuite in Erlenmeyer anzichè in tubi) hanno sempre dato la prova della fissazione dell'azoto libero atmosferico rispetto ai controlli, usando tutti gli accorgimenti consigliati per tali determinazioni (60-62).

Lo stesso valga per i fissatori di azoto anerobici, tipo *B. amylobacter* Bredemann. Questi microrganismi, coltivati in tubi contenenti tasselli di patata ed acqua, danno sempre abbondante formazione di schiuma in superficie del liquido, accompagnata dal caratteristico odore di acido butirrico, e, al microscopio, col semplice preparato a fresco fatto in una goccia di soluzione di Lugol, nelle prime 48-72 ore di termostato (cioè prima della sporificazione) sono sempre svelabili mercè la loro colorazione totale o parziale in bleu-viola.

Le numerose ricerche compiute dal nostro Istituto sulla microbiologia del suolo (fra l'altro, per ben nove anni — dal 1927 al 1935 — abbiamo studiato l'azione dei vari tipi di lavorazione del suolo agrario sui microrganismi terricoli nel Campo sperimentale di Cerignola (63)) hanno confermato la bontà del metodo di Hiltner e Stormer per la determinazione soprattutto degli azotofissatori, i cui risultati debbono ritenersi non meno esatti di quelli che si ottengono coi granelli di terra in piastre di silico-gel, o con uno qualsiasi degli altri metodi proposti, fra quelli elencati nella tabella I, per lo studio delle attività funzionali microrganiche.

Tab I.

Modo di valutazione delle attività funzionali microorganiche	Classifica dei metodi	Substrato nutritivo adoperato	Principali autori che hanno messo in pratica i vari metodi
Determinazione numerica dei microrganismi specifici presenti	Diretti	Soluzione nutritiva	Hiltner e Störmer Löhnis Millard Cutler (Scuola di Rothamsted) Rossi e Riccardo Wilson Lewis De Rossi
Valutazione chimica ponderale dell'attività funzionale dei microrganismi specifici		Terreno settico	Lipman e Brown Waksman Christensen Fischer Remy e Rösing Stevens e Whitters
		Soluzione nutritiva	Remy Löhnis Barthel Buhlert e Fickendey Perotti
	Speciali	Silico-gel imbevuto di soluzione nutritiva	Winogradsky Curie

Il metodo di Hiltner e Stormer (59) – che si può considerare, d'altronde, una derivazione diretta dei metodi di Luigi Pasteur – è stato applicato con successo da Löhnis (64), da Millard (65), da Wilson (66), da Lewis (67), nonché da Cutler (68), che lo ha adoperato anche per determinare il numero dei protozoi attivi nel terreno. Anche De Rossi (60), per determinare il numero dei microrganismi specifici del terreno, non esita a consigliare di « *sostituire la silice gelatinosa coll'agar semplice, e di eseguire la semina delle piastre non coi grani di terra ma con sospensione di terra di progressivamente crescente diluizione* ».

Ma, data la grande importanza che può assumere questa categoria di microrganismi (che, d'ordinario, si riscontrano in numero piuttosto scarso nei terreni agrari) se riesce ad insediarsi in terreni sterili in via di formazione agraria, abbiamo adoperato, inoltre, le *piastre molate* di Winogradsky, nonché il nostro dispositivo (33) per cercare di ottenere culture elettive di azotobatteri. Nè abbiamo ommesso di eseguire alcune ricerche su piastre di terreno artificiale, che, in precedenti esperienze (34), ci avevano dato risultati soddisfacenti per lo studio di altri microrganismi.

La metodica seguita per lo studio dei nitrificanti è stata quella dei granelli di terra in piastre di silico-gel, e, parallelamente, quella per diluizione, adoperando grandi Erlenmeyer con piccole dosi di soluzione di

Barthel (69). In quanto ai *nitrificanti*, non ci stancheremo mai di ricordare (70) le difficoltà che s'incontrano, sia per isolarli che per differenziare quantitativamente i nitrici dai nitrosi. Pertanto, non possiamo accogliere che con riserva i risultati di quegli Autori che pretendono di dare delle cifre per i *batteri nitrici*.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze, per la determinazione dei nitrificanti (nitrosi+nitrici), bisogna convenire che: o si tien conto dei soli risultati forniti dai *centri di densità dei batteri nitrosi* intorno ai granelli di terra collocati sulle piastre di silico-gel (allestite secondo le istruzioni di Winogradsky), o saranno le sole determinazioni chimiche (col reattivo di Trommsdorf, alla difenilamina solforica) ad indicare la completa ossidazione del *solfato ammonico* fino al termine *nitrate*, com'è per la soluzione di Barthel, insemata con sospensioni di terreno a crescente diluizione.

Lo stesso Winogradsky, d'altra parte, ammette quanto noi sosteniamo: l'illustre Maestro così scrive a pag. 422 della sua settima memoria (17) sugli « organismi della nitrificazione »:

« Le procédé, comme il a été déjà indiqué, ne vise que les microbes « de la nitrification qui sont tenus répondre du phénomène entier. En effet, « à l'encontre des idées qui paraissent encore en cours, c'est la nitrification « qui prime le phénomène, tant au point de vue physico-chimique (libération de l'énergie, taux d'oxygène entré en combinaison, etc.) qu'au point « de vue microbiologique. La nitrification n'est qu'une sorte d'annexe, de « complément nécessaire et assuré de la première phase. Aussi, le fait que « les microbes de la nitrification sont très malaisés à repérer, et leur densité « impossible à évaluer, n'empêchera pas le procédé de fournir des résultats « d'une exactitude suffisante pour le but proposé ».

Se a ciò si aggiunge il fatto che per l'allestimento delle piastre destinate allo sviluppo dei batteri nitrici occorrono sali puri di nitrito di sodio o di potassio, *essenti da nitrati* (il che è molto difficile, quando si pensi che in nostre precedenti esperienze (70) anche il nitrito di sodio purissimo di Kalbaum diede la reazione dei nitrati, per cui concludemmo che molte - se non tutte - delle esperienze eseguite finora sui *batteri nitrici* dovrebbero forse essere sottoposte a revisione!) è evidente come appaia ben giustificato il dubbio che non tutte le colonie sviluppantisi su agar nitrato o su silico-gel nitrato debbano attribuirsi senz'altro ai soli batteri nitrici!

E lo stesso Winogradsky (17), parlando del genere *Nitrobacter*, ammette lo sviluppo di germi banali:

« D'après les anciennes observations, l'espèce - Egli scrive - est cultivable sur la gélose nitrifiée. Nous préférons l'emploi du silico-gel nitrifié, « milieu plus favorable pour les nitrificateurs et dont les propriétés de sélections écartent plus complètement la souillure avec germes banaux.

« Ajoutons qu'en étudiant différents échantillons de sol, on est tombé « sur un microbe qui lui ressemblait par ses cellules en coin, mais qui « formait des *Kystes* à l'instar de *Nitrosocystis*. Malheureusement, la culture de ce microbe que l'on a dénommé *Nitrocystis* a été bientôt perdue. « Il y aurait à rechercher, ne serait-il pas l'agent de nitrification spécialement

« adapté aux sols forestiers, comme c'est le cas pour le *Nitrocystis*: recherches recommandées à ceux qui étudient spécialement ces sols ».

In quanto allo studio dei microrganismi catabolici, mentre per i putrefacenti e per i denitrificanti si è seguito il metodo per diluizione, secondo Hiltner e Störmer (soluz. di Giltay per i denitrificanti (69) e soluz. all'1,5 % di peptone per gli ammonizzanti o putrefacenti), per i degradatori della cellulosa si sono adoperati, oltre al metodo di Winogradsky delle piastre al silico-gel (14), anche due metodi elaborati nel nostro Istituto:

1) Interramento del nostro dispositivo (33) per colture elettive, da noi altre volte adoperato per i microrganismi del gruppo « *Cytophaga* » (71);

2) piccole Erlenmeyer, della capacità di 100 cc., nel cui fondo si poneva un blocchetto di carbonato di magnesio, sul quale si adagiava orizzontalmente un dischetto di carta da filtro. In ciascuna Erlenmeyer, dopo sterilizzazione in autoclave a 120° C., si aggiungevano, colle dovute precauzioni dell'asepsi, cc. 3 della soluz. A e cc. 15 della soluzione B, sterilizzate precedentemente e separatamente:

Soluzione A: fosfato monopotassico gr. 1; solfato di magnesio gr. 0,5 cloruro di sodio gr. 0,5; solfato di ferro gr. 0,01; solfato di manganese gr. 0,01; carbonato di calcio gr. 2; acqua distillata cc. 200.

Soluzione B: nitrato di potassio gr. 4; acqua distillata cc. 1000.

La soluzione A corrisponde a quella consigliata da Winogradsky, colla variante che noi abbiamo aggiunto l'1% di CaCO₃. Winogradsky, invece, aggiunge una piccolissima quantità di CaCO₃ quando si tratta di preparare la soluzione per impregnare il silico-gel destinato alle colture elettive di citofaghe. Anche per il nitrato di potassio, c'è da osservare che noi abbiamo fatto una soluzione, mentre Winogradsky lo usa allo stato secco e in polvere, spargendolo sulla superficie del silico-gel.

Le piccole Erlenmeyer, tranne i controlli, venivano insemminate colle medesime diluizioni progressive di terreno usate per gli altri gruppi di microrganismi.

Tutte le Erlenmeyer (sia quelle destinate allo sviluppo dei nitrificanti che quelle destinate ai denitrificanti e ai degradatori della cellulosa) venivano incubate a 20° C.; i tubi di soluz. Beijerinck per gli azotobatteri si tenevano invece a 28° C., mentre quelli di patata e di soluz. di peptone si tenevano a 34° C.

Sulla temperatura di incubazione delle piastre e sul periodo di permanenza delle stesse in termostato, si seguivano le seguenti modalità: le piastre di silico-gel e quelle di terreno artificiale (preparate come si dirà avanti) si tenevano a 20° C. e in camera umida per un mese; le piastre di agar-brodo di carne (per la carica batterica ed actinomicetica) a 30° C. per quattordici giorni; le piastre di agar acido sintetico per gli eumiceti (pH = 4,0), preparato secondo Waksman (72), a 28° C. per tre giorni.

In quanto alla metodica « micropedologica », come la chiama Kubiena, abbiamo seguito innanzi tutto la tecnica adoperata dal nostro Istituto fin dal 1927, consistente essenzialmente in un dispositivo (fig. 3) destinato a reggere un porta-oggetti e permettere di poterlo calcare contro il terreno per portarne via l'impronta e con essa buon numero di microbi. In conclu-

sione si cerca di fare quello che in batteriologia si chiama un *preparato per impronta* ricavato da una colonia (*Klatsch-préparat* dei Tedeschi).

E si usa il « timbro » dopo avere spalmato il vetrino, pulito radicalmente, di liquido speciale, scartando l'agar, il quale possiede una flora ed una microfauna sua propria, e può inquinarsi, inducendo così doppiamente in errore; quindi si fissa col calore come fosse un preparato comune, si colora coll'eritrosina fenicata, aiutandosi col calore, si lava abbondantemente si asciuga.

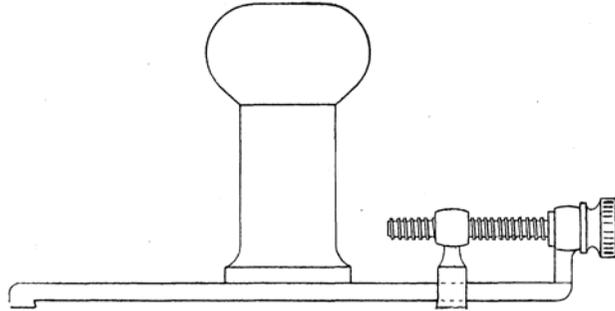


Fig. 3.

L'osservazione si può fare con un obbiettivo cercatore, salvo a controllare ed ingrandire quello che si vede, con obbiettivo ad immersione.

Oltre ai *preparati per impronta*, si è adoperato il metodo dei vetrini sepolti, noto col nome di Rossi-Cholodny (*), consistente nel seppellire nel terreno delle coppie di vetrini portaoggetti ben puliti con o senza sostanze spalmate, a seconda che si voglia influire con eventuali azioni chemiotattiche, ovvero si vogliono avere espansioni naturali (colonie) dei microbi sia dall'alto che dal basso ed allo stesso livello. In tal modo si può - usando l'espressione del Rossi - gettare uno sguardo reale e non metaforico nel contenuto batteriologico del terreno.

Alcune osservazioni sulla natura dei terreni agrari della zona alta vesuviana e sulle variazioni climatiche dell'annata 1941.

Le analisi più recenti che possediamo sulle terre vesuviane, o meglio, sulle terre giovani vesuviane (rocce che, pur avendo raggiunto un disfacimento più o meno spinto, non hanno per nulla modificato la loro composizione chimica) sono quelle di Bottini (73).

Basta un rapido sguardo ai numerosi dati riportati dall'A. per convincersi della grande ricchezza di questi terreni in elementi fertilizzanti.

*) In omaggio alla verità, è al Rossi che spetta la priorità di tale metodo. Infatti, mentre la pubblicazione del Rossi (30) è del 1927, quella di Cholodny (38) è del 1930! La priorità del Rossi venne in seguito riconosciuta anche da Conn, come appare dal seguente testo: « La memoria e l'estratto (scriveva il Rossi nel 1933 a pag. 261 bis del « lavoro Della attendibilità del « metodo Rossi » per la conta dei « glomeruli batterici » « del terreno agrario) erano già stampati quando ho ricevuto una lettera del Conn, che « riconosce giuste le mie osservazioni per ciò che lo concerne, dicendole cagionate da fatti « estranei alla sua volontà. Ringrazio sentitamente il Conn per la gentile lettera ».

Ciò che appare un po' strano nelle analisi è il valore del pH, che, su 52 determinazioni, è risultato di 6,0 fino a 6,4 in ben 15 campioni, mentre per i rimanenti ha oscillato fra 6,5 e 7,2.

«Sembra strano - scrive Bottini - come rocce così giovani, così ricche di basi, all'inizio ancora della loro decomposizione, e che, se per poco vengano a contatto con acqua, le impartiscono immediatamente reazione alcalina, solo per aver raggiunto un grado di disgregazione più o meno avanzata debbano avere reazione neutra, anzi, ancora di più, debbano tendere all'acidità».

Secondo Bottini, l'anomalia apparente dei valori della reazione sarebbe dovuta alla presenza dei costituenti organici. In questi terreni si fanno frequenti ed abbondanti letamazioni, dando luogo ad acidi organici, i quali agirebbero nel terreno come energici fattori di decomposizione e fisserebbero in combinazioni chimiche o di assorbimento i prodotti di tale decomposizione. Parte della loro acidità rimarrebbe però libera, e sarebbe appunto questa acidità quella che, comunicandosi all'acqua, si avverte coi mezzi di misura.

Sui terreni coltivati della zona alta Vesuviana avremo occasione di ritornare in seguito, non potendo non tener conto, in tutte le nostre esperienze, della grande influenza che può esercitare ai fini dell'insediamento della vita sulle lave sterili la vicinanza di campi o giardini, in cui ammiriamo il rigoglio di alberi vari, di vigneti ecc.

Così, il Colle Canteroni - dove travasi l'Osservatorio Vesuviano col giardino e l'Eremo - è poco distante dal Colle Umberto! Ma, mentre il Colle Canteroni fa parte dell'antica muraglia circolare del Somma, per cui i terreni intorno all'Osservatorio sono da considerarsi come *terre vecchie* del Monte Somma, il Colle Umberto è stato costruito in un periodo di appena quattro anni, coll'emissione di mc. 20.000.000 di lava.

I dati riportati da Bottini per il terreno che travasi nel recinto dell'Osservatorio Vesuviano, figurano nella Tab. II^a.

In quanto alla composizione delle lave del Vesuvio, queste, in tutte le eruzioni storiche, sono di natura assai simile, ma quasi mai identiche, anche in eruzioni assai vicine, come quelle del 1871 e 1872. Sono delle Leucotefriti con qualche Leucobasanite, formate essenzialmente dall'aggregamento di una infinità di cristalli di Leucite ed Augite (e Olivina nelle seconde) disseminate porfiricamente in una pasta grigio-scura o nerastra, apparentemente omogenea, risultante degli stessi minerali, più il Plagioclase, che non si presenta mai in cristalli grossi. Ordinariamente associati al Plagioclase, all'Augite, alla Leucite, ed, evidentemente, all'Olivina, si trovano in minor quantità Magnetite, Mica, Sanidino, Nefelina, mentre nelle cavità e nelle fenditure si rinvengono frequentemente Sodalite, Oligisto, e più raramente Häüyna, Granato e Apatite. Ordinariamente la Leucite e l'Augite si vedono ad occhio nudo disseminati nella lava, ma anche la pasta apparentemente omogenea di questa, vista sotto il microscopio, appare formata da un ammasso di microscopici cristalli dei minerali nominati, cementati insieme da una piccola quantità di materia vitrea. Secondo le antiche analisi del Fuchs, riportate dal Mercalli (74-75), la

TAB. II

Profondità	Attacco con HCl conc. e bollente solubili in HCl												Estratto citrico		Estratto acquoso		pH	Acqua igroscopica	Perda a fuoco	Humus	Azoto		
	Insolubile in HCl	Si O ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Mn O	Ca O	Mg O	K ₂ O	Na ₂ O	Disgrate con HCl	P ₂ O ₅	K ₂ O	Residuo a 100	Cl									
cm.	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%					
0-20	71,058	0,190	11,543	4,225	tr.	2,870	1,350	4,870	2,930	0,292	0,110	tr.	3,187	5,254	0,022	0,162	0,063	0,001	6,3	0,920	1,010	0,94	0,106
40-50	62,789	0,340	14,845	4,720	tr.	4,480	1,104	4,850	2,817	0,255	0,042	tr.	2,561	3,785	0,019	0,024	0,051	0,001	6,1	1,370	1,400	1,24	0,118

TAB. III

Decade di osservazione	Gennaio		Febbraio		Marzo		Aprile		Maggio		Giugno		Luglio		Agosto		Settembre		Ottobre		Novembre		Dicembre	
	mm. pioggia	Gradi C.																						
1 ^a decade	86,2	6,0	72,6	5,6	24,5	9,0	33,7	9,9	38,3	10,6	3,1	17,8	2,4	20,7	0,0	20,4	17,9	17,0	42,2	17,4	50,5	9,3	25,0	6,5
2 ^a »	62,1	5,2	27,7	8,3	38,7	6,1	17,7	7,8	71,5	11,5	8,2	14,1	0,0	21,9	0,0	21,7	15,0	15,1	64,5	12,0	85,0	12,2	21,5	7,4
3 ^a »	42,4	6,4	78,5	6,1	0,0	8,2	7,1	9,6	1,7	15,2	0,0	20,7	6,6	21,8	4,0	19,8	59,7	16,4	121,4	10,3	9,0	9,7	15,8	2,4
mm. piog- gia caduta in un mese	190,7		178,8		63,2		58,5		111,5		11,3		9,0		4,0		92,6		228,1		144,5		62,3	

media composizione chimica delle lave vesuviane, dedotta da 32 lave diverse, è la seguente:

Silice	48,29
Allumina	19,55
Ossido e sesquiossido di ferro	10,94
Calce	9,38
Magnesia	4,13
Soda	3,29
Potassa	5,26

Totale 100,84

Un fattore di grande importanza, di cui va tenuto il debito conto in alcune delle nostre esperienze, è dato dalle precipitazioni meteoriche, le quali possono essere causa di profondi sconvolgimenti degli strati superficiali del terreno, con continui rimescolamenti di materiale eruttato e terra, modificando non poco il substrato su cui dovranno insediarsi gli infinitamente piccoli, la flora spontanea e le piane coltivate. Ma la pioggia, sul Vesuvio, si combina spesso con un altro fenomeno, l'emissione di gas, dando origine a precipitazioni speciali che prendono, per il loro effetto, il nome di *acque caustiche*.

Dai dati pubblicati dal Malladra (76) — che vanno, con notevoli lacune, dal 1863 al 1913 — risulta una media annua di mm. 748,7 di pioggia, con un massimo di mm. 1629 (nel 1907), ed un minimo di mm. 332 (nel 1909). I risultati del 1941 sulle precipitazioni atmosferiche e sulla temperatura dell'aria sono riportati nella Tab. III^a.

L'umidità relativa dell'aria raggiunge in estate 64-65 centesimi nelle ore più calde, per cui sono abbondanti le rugiade proprio quando difettano le precipitazioni. Per quanto riguarda l'annata 1941, si sono avute le seguenti cifre medie per decadi:

Gennaio: 79, 80, 83; Febbraio: 72, 79, 77; Marzo: 76, 65, 67; Aprile: 75, 74, 73; Maggio: 84, 79, 61; Giugno: 64, 71, 65; Luglio: 54, 64, 65; Agosto: 67, 60, 74; Settembre: 54, 68, 61; Ottobre: 74, 76, 83; Novembre: 80, 77, 66; Dicembre: 57, 86, 75.

Risultati ottenuti col metodo per diluizione di Hiltner e Störmer e col metodo delle piastre (agar-brodo, silico-gel, agar acido sintetico).

Le analisi venivano eseguite ogni tre mesi, e i risultati avuti col metodo di Hiltner e Störmer sono esposti e riassunti nella tabella IV, in cui gli schizomiceti sono espressi con numeri arabi progressivi, i quali accennano al grado di diluizione raggiunto per ciascuna categoria, e, com'è noto, più propriamente: 1 = almeno 100 germi; 2 = 1000; 3 = 10.000; 4 = 100.000; 5 = 1.000.000; 6 = 10.000.000; 7 = 100.000.000; 8 = un miliardo.

La tabella V comprende, invece, i risultati ottenuti col metodo delle piastre.

N. Campioni	Stazione rispetto alla vegetazione	Gruppi di microrganismi specifici	Epoca dei prelevamenti e risultati				Osservazioni
			Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre	
I	Vicino ad <i>Alnus cordata</i>	Azotobatteri	0	1	0	1	Fra i degradatori della cellulosa aerobici comprendiamo, non solo i microrganismi dei generi <i>Cytophaga</i> , <i>Cellvibrio</i> e <i>Cellfalcicula</i> di Winogradsky, ma anche gli eumiceti dotati di evidente potere cellulolitico. E' noto come Halina Felsz Karnicka (77) abbia isolato, per es., ben 13 specie di funghi decomponenti la cellulosa da terreni della Stazione Agraria di Gobieszyn.
		Amilobatteri	1	0	0	1	
		Nitrificanti	0	1	0	0	
		Denitrificanti	2	1	1	2	
		Ammonizzanti	2	2	2	3	
		Degradatori cellulosa	1	1	0	0	
II	Vicino a <i>Spartium junceum</i>	Azotobatteri	0	1	0	0	
		Amilobatteri	0	0	0	0	
		Nitrificanti	1	1	0	0	
		Denitrificanti	2	1	1	1	
		Ammonizzanti	2	2	2	2	
		Degradatori cellulosa	0	0	0	0	
III	Vicino a piante di <i>Centranthus ruber</i>	Azotobatteri	0	1	0	0	
		Amilobatteri	0	0	0	0	
		Nitrificanti	0	1	0	0	
		Denitrificanti	1	1	1	1	
		Ammonizzanti	2	2	2	2	
		Degradatori cellulosa	0	0	0	0	
IV	Vicino a Graminacee spontanee	Azotobatteri	0	1	0	0	
		Amilobatteri	1	0	0	1	
		Nitrificanti	0	0	0	0	
		Denitrificanti	1	1	1	2	
		Ammonizzanti	3	2	1	3	
		Degradatori cellulosa	0	0	0	1	

Risultati ottenuti con altri metodi e colla sperimentazione in situ.

Se il metodo classico delle piastre rappresenta per alcuni Autori il solo sistema per isolare e studiare gran parte delle specie microbiche esistenti in un terreno qualsiasi, per noi è ben poca cosa se non è accompagnato da ricerche collaterali *in situ* e in Laboratorio, seguendo altre modalità sperimentali, onde poter mettere in confronto i vari risultati, tenendo nel massimo conto quelli che si ottengono in pieno campo.

Accanto ai molti preparati per impronta (colorati a caldo con eritrosina all'1% in soluzione fenica al 5%) si è adoperato il metodo dei vetrini portaoggetti sepolti, spalmati o non di sostanze chemiotattiche, nonchè le *piastre molate* di Winogradsky e il nostro dispositivo per ottenere culture elettive di alcuni microrganismi specifici. Mentre i vetrini sepolti, senza alcuna aggiunta sulle superfici di contatto col terreno, hanno rivelato una microflora varia, ma non molto abbondante, quelli spalmati con salda d'amido hanno riconfermato, in alcune zone (specie vicino ad *Alnus cordata*)

TAB. V

N. Campioni	Stazione rispetto alla vegetazione	Microorganismi	Agar-brodo carne				Silico-gel				Agar acido sintetico				Osservazioni	
			Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre	Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre	Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre		
I	Vicino ad <i>Alnus cordata</i>	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe (1) Actinomiceti Eumiceti	1.560.000	980.000	575.000	800.000	0	6	0	2	0	0	0	0		(E) Nel termine <i>citofaghe</i> facciamo rientrare anche i Cellvibrioni e le Cellulolicole.
			0	0	0	0	0	0	0	0	40.000	20.000	8.000	20.000		
			680.000	530.000	451.000	740.000	0	4	0	4	0	0	0	0		
			0	0	0	100	0	0	0	0	10.000	20.000	10.000	30.000		
II	Vicino a <i>Spartium junceum</i>	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe Actinomiceti Eumiceti	362.000	640.000	274.000	381.000	0	4	0	0	0	0	0			
			0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4		
			480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
III	Vicino a piante di <i>Centrurus ruber</i>	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe Actinomiceti Eumiceti	480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0			
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
IV	Vicino a Graminacee spontanee	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe Actinomiceti Eumiceti	480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0			
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
						10.000	4.000	10.000	20.000	10.000	4.000	10.000	20.000			

— benchè in numero scarso — la presenza di forme molto simili agli azotobatteri (*), come appare dalla fig. 4.

Anche il nostro dispositivo (fig. 5) (contenente il seguente substrato: sabbia silicea gr. 250, carbonato di calcio gr. 65, carbonato di magnesio gr. 10, argilla bianca « Erba » gr. 40, fosfato bipotassico gr. 0,150, mannite gr. 10, acqua distillata cc. 125) — interrato in prossimità dei posti dove si erano prelevati i campioni per la esecuzione del metodo di Hiltner e Störmer, nonchè per l'allestimento delle piastre di agar-brodo di carne, di silico-gel e di agar acido sintetico — ha dato, non solo la conferma della presenza degli azotobatteri, in alcune località, ma ci ha permesso di osservare anche lo sviluppo di questi interessanti microrganismi in un impasto artificiale sottoposto a continue variazioni climatiche durante due mesi di permanenza in piena terra dell'apparecchio (aprile e maggio 1941). Le culture fatte in soluzione Beijerinck con l'impasto, dopo il disotterramento del dispositivo, hanno dato luogo a sviluppo abbondante dell'*Azotobacter chroococcum* Beij.,

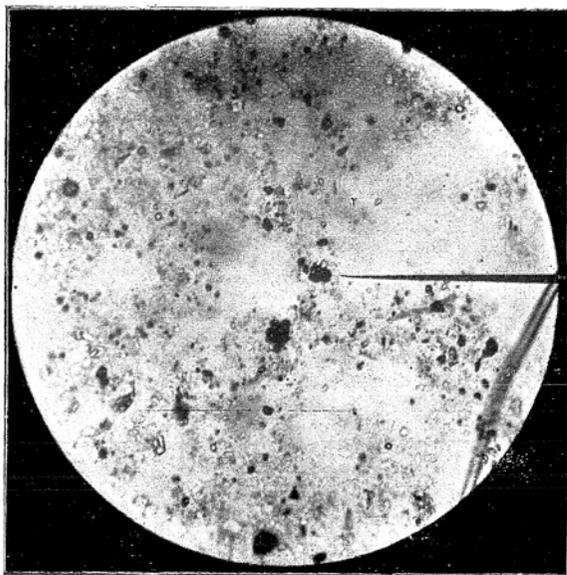


Fig. 4.

mentre i preparati per impronta dello stesso impasto, colorati con eritrosina fenicata, hanno messo in evidenza colonie di azotobatteri, le cui cellule, però, presentavano dimensioni più piccole di quelle che ordinariamente si sviluppano nei substrati di laboratorio (si veda fig. 6). (continua)

*) Non si può asserire, dal semplice esame dei vetrini e dopo le esperienze condotte da Dianowa e Woroschilowa, che si tratti sempre di Azotobatteri; tuttavia, la presenza della sostanza chemiotattica aggiunta sul vetrino, adatta per questo gruppo di microrganismi, e la forma tipica delle cellule, lasciano ritenere che la loro identificazione non debba mettersi in dubbio.

Ricerche su un fermento lattico sporigeno (*Bac. thermoacidificans*)

Dott. P. Renco

(Ricevuto il 14 aprile 1942-XX)

Durante le ricerche sulla microflora del siero fermento adoperato nella fabbricazione del formaggio grana, è stato isolato un bastoncino mobile e sporigeno, capace di produrre notevoli quantità di acido lattico da una numerosa serie di zuccheri. Consultando la letteratura sull'argomento si è potuto constatare che solamente un germe presenta alcune caratteristiche affini con il bastoncino in parola, e precisamente il *Bac. lactis thermophilus* isolato da Gorini ¹⁾ dal latte sterilizzato del commercio. Quest'ultimo, pure essendo un bacillo sporigeno capace di acidificare il latte, presenta alcuni caratteri completamente diversi da quelli riscontrati per il bacillo isolato dallo scrivente. Tali differenze si notano soprattutto nella mobilità, nell'aspetto delle colonie sull'agar e sulla patata, nel coagulo del latte, nelle temperature di sviluppo e nella forma delle spore ²⁾.

Si crede perciò opportuno di rilevare i principali caratteri del bacillo isolato onde poterlo classificare.

Forma. - Sull'agar brodo e agar siero-peptone si presenta sotto forma di bastoncini di $0,6 - 0,8 \times 2,4 - 9 \mu$ (la lunghezza più comune è di $7-8 \mu$), isolati o riuniti a due a due. Assai spesso, ed in particolar modo sull'agar siero peptone, forma corti filamenti un po' ricurvi che misurano circa $16-24 \mu$. E' mobile, ma in tutte le culture solo poche cellule presentano movimenti piuttosto lenti. La colorazione delle ciglia risulta alquanto difficile, però con il metodo de' Rossi si riesce a mettere in evidenza bastoncini peritrichi muniti di poche ciglia. È Gram positivo.

In tutti i più comuni terreni nutritivi forma le spore, assai facilmente rilevabili, specialmente nelle colonie superficiali su agar-brodo. Le spore sono ovali, più grosse del bastoncino e sempre terminali, dando luogo a caratteristiche forme di plectridio. Le forme rimangono pressochè costanti in tutti i comuni terreni nutritivi. Ciò è stato messo in evidenza particolarmente facendo delle colorazioni negative con bleu di china. Per tale scopo si portava su un vetrino sgrassato un'ansata di acqua, colla quale

1) Gorini C. - Studio critico-sperimentale sulla sterilizzazione del latte. Stab. G. Ci-velli, Milano, 1894.

2) Non si è potuto constatare l'eventuale esistenza degli altri caratteri differenziali, come per es. la capacità fermentativa sugli zuccheri, la qualità e quantità degli acidi prodotti, la produzione dell'indolo e della catalasi, non essendo riportati detti caratteri nella pubblicazione del Prof. Gorini, gentilmente offertami. Nè si sono potute fare ricerche comparative per la mancanza di culture di *Bac. lactis thermophilus*.

si mescolava un po' del materiale della colonia in esame; senza lasciare asciugare si aggiungeva coll'ansa un po' della soluzione di bleu di china al 5%, si distribuiva sul vetrino in modo di formare zone più o meno scure. Si seccava all'aria o a 40-50° C e si montava con balsamo.

Il preparato riprodotto nella figura n. 1 è stato ottenuto nel modo sopraindicato.

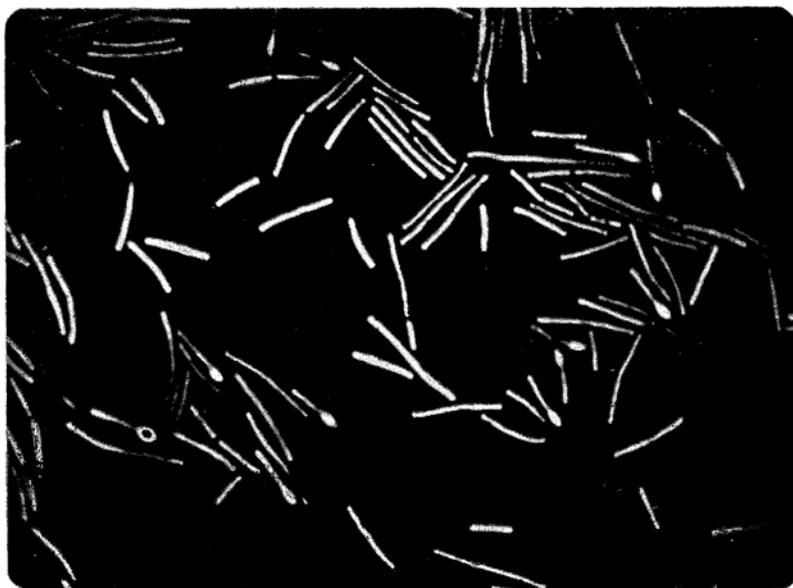


Fig. 1 - *Bac. thermoacidificans* dalle colonie su agar brodo di 3 giorni a 45° C. Colorazione con bleu di china. Ingr. 1900.

Gelatina. - Sono state allestite culture per infissione tenendole in incubazione alle temperatura di 20-21°, 30°, 40°, 45°, 50° e 55° C. A 20-21° C. si è potuto osservare un leggero sviluppo dopo 8 giorni lungo tutto il canale d'innesto. Dopo 15 giorni raggiunto il massimo sviluppo l'innesto si presentava a forma di sottile chiodo di color bianco-sporco. Anche dopo un mese non si è potuta constatare la liquefazione. Alle temperature tra 30° e 55° C il comportamento è stato pressochè uguale, unica differenza consisteva sulla rapidità dello sviluppo. La gelatina liquefatta per alte temperature si intorbidiva leggermente verso il fondo e fortemente verso la superficie, con formazione di un sottile velo superficiale, in seguito si ebbe la formazione di un deposito non troppo abbondante. Dopo 15 giorni di permanenza in termostato le culture furono tenute per circa 6 ore a 40° C e poi portate alla temperatura d'ambiente. In tutte le provette si ebbe una pronta e completa solidificazione. La gelatina rimase solida anche per altri venti giorni di permanenza alla temperatura di 20-21° C (dopo di che le culture furono abbandonate).

Nelle piastre di gelatina si ebbe la comparsa di colonie dopo 12 giorni circa sotto forma di punticini bianchi appena visibili ad occhio nudo, colonie che dopo altri sette giorni subirono un aumento appena percepibile per poi rimanere stazionarie. Viste al microscopio a 90 x si presentavano perfettamente rotonde con margine liscio di color giallognolo e molto finemente granulose.

Agar brodo — Colonie superficiali a 45° C sono bianco-giallognole semitrasparenti di struttura «cristallina» o granulare. Il diametro può arrivare sino a 4 mm. circa. Talvolta sono rotondeggianti con margini lisci o finemente increspati, talvolta con ramificazioni irregolari filamentose, terminanti a punta. Spesso a 40° C presentano nel centro una zona circolare più o meno trasparente ed uniforme, talvolta molto nitida, talvolta appena accennata (vedi figura n. 2). Visto al microscopio, il centro non appare uniforme come ad occhio nudo, ma sotto forma di chiazze rappresentate dai bastoncini non sporificati in mezzo agli altri sporificati. Le colonie sono ben sviluppate già dopo 24 ore, ma raggiungono il massimo sviluppo dopo 3-4 giorni.

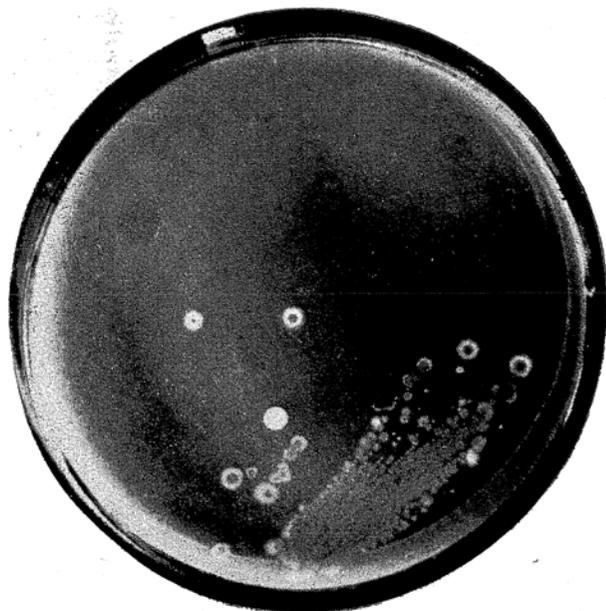


Fig. 2 - Colonie superficiali del *Bac. thermoacidificans* su agar brodo dopo 5 giorni a 40° C.

Agar siero peptone. — Colonie superficiali dopo 24 ore a 45° C raggiungono il diametro di 1-2 mm., sono rotondeggianti con margini lisci, di colore bianco-grigio, trasparenti con struttura uniformemente cristallina o granulosa. Dopo 30 ore aumentano di diametro, diventano più spesse e colorate leggermente in giallo sporco, salvo il margine che rimane

di struttura cristallina semitrasparente. Dopo tre giorni il diametro arriva a 5 mm., il centro per un raggio di 1-2 mm. si fa più spesso ed il colore giallo tende a quello arancio che si fa sempre meno intenso verso il margine che rimane bianchiccio, semitrasparente con struttura cristallina e finemente increspato. Le colonie profonde dopo 3-5 giorni a 40° C, sono rotondeggianti bianco-giallognole, con un diametro che varia da 1/3 - 1/2 mm. circa. Viste a 90 ingrandimenti presentano contorni lobati, sono bitorzolute in modo da assomigliare al frutto del gelso.

Agar latte. — Le colonie, quasi uguali a quelle su agar siero peptone, si circondano di un alone opaco, alone che si allarga nei primi sette-otto giorni e non cambia con il passar del tempo.

Siero peptone. — A 20-21° C dopo 30 giorni non si ebbe alcun sviluppo. Dopo 24 ore a 45° leggero intorbidamento, nei giorni seguenti si forma sul fondo un discreto precipitato grumoso, dal quale risalgono i grumi sulle pareti per qualche centimetro di altezza, grumi che diventano sempre più piccoli sino a scomparire verso la superficie del liquido. Leggerissimo velo superficiale.

Brodo. — Il brodo a 50° C intorbida verso la superficie con un leggerissimo velo di color grigio-biancastro, che si innalza un po' sulle pareti della provetta e che, scuotendo, intorbida la superficie del liquido. Dopo un paio di giorni si ha un discreto deposito granuloso sulle pareti e sul fondo. Il pH rimane immutato. A 20-21° C dopo 30 giorni non si è potuto osservare alcun sviluppo.

Latte tornasolato. — La colorazione scompare entro 48-60 ore, dopo altre 20 ore circa si ha la coagulazione.

Latte magro. — Coagulo compatto e ben consistente senza separazione di siero si verifica in 7 giorni a 30° C, in 3 giorni a 40 e 45° C, in 45 ore a 50° C, in 60 ore a 55° C e in 10 giorni a 58°. A 60° dopo 20 giorni il latte non risulta coagulato. Anche a 25° C non si ha la coagulazione entro 20 giorni.

Le colture in latte emanano un odore caratteristico, non ben definibile e piuttosto poco gradevole. Tale odore permane anche dopo che le culture sono state sottoposte alla ebollizione per un'ora.

Infissione nell'agar siero peptone. — A 45° C dopo 5 giorni si ha nel canale solo un debolissimo sviluppo verso la parte superiore, mentre sulla superficie attorno al punto d'infissione si forma patina di color biancosporco.

Potere fermentativo. — Produce acidità e non gas dai seguenti alcoli e glucidi: glicerina, xilosio, arabinosio, ramnosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffiniosio, destrina, amido e glicerina. Non produce acidità da inulina e mannite.

Patata. — A 40° C dopo 6 giorni si sviluppano colonie a forma di goccia, aventi un diametro di circa un mm. leggermente colorate in gialliccio, nel centro un po' rilevate e un po' più intensamente colorate.

Produzione di acidità. — La massima produzione di acidità viene raggiunta dopo 10 giorni a 40° C che espressa in acido lattico risulta di 0,84 % (detta cifra rappresenta solo l'acidità di fermentazione). Il pH minimo osolla attorno 4,6. Vengono prodotte pure piccole quantità di acidi volatili; (l'acidità volatile è risultata di 0,04 %). Entro sei giorni l'acidità generalmente non supera lo 0,6 %. L'acidità fissa è dovuta all'acido lattico che è stato estratto coll'etere.

Prima dell'estrazione, la cultura in latte magro è stata riscaldata a bagnomaria per circa 20 minuti in modo da favorire la separazione del coagulo dal siero e poi filtrata. 50 cc. del siero acido così ottenuto veniva trattato con 100 cc. di acqua di calce per precipitare gli acidi organici (infuori all'acido lattico). Si allontanava il precipitato colla filtrazione, al filtrato si aggiungeva altri 10 cc. di acqua di calce e si filtrava nuovamente. Ciò si ripeteva sino a che non si aveva più il precipitato. Il filtrato così ottenuto, che si presentava limpidissimo, si evaporava a bagnomaria, previa aggiunta di 2 % di acido solforico, concentrandolo a 30 cc. Detta quantità si versava in un cilindro graduato mentre la capsula usata per la evaporazione veniva lavata in due riprese coll'acqua distillata in modo di raggiungere nuovamente il volume primitivo, cioè 50 cc.

Il siero così trattato risultava privato di acidi volatili ed altri acidi organici liberi capaci di falsare la ricerca dell'acido lattico. Per estrarre l'acido lattico si sbatteva energicamente 10 cc. del liquido così trattato con 100 cc. di etere, si lasciava a riposo per 10', si decantava e si evaporava l'etere e titolava l'acidità del residuo.

L'acidità titolata del residuo così ottenuto, dopo otto o nove estrazioni (cioè finchè il residuo non si presentava quasi neutro) era pressochè uguale a quella fissa di fermentazione della cultura in latte magro. Il che autorizza dedurre che l'acidità prodotta nelle culture di latte magro è dovuta quasi esclusivamente all'acido lattico.

Resistenza delle spore. — Le culture ricche di spore seminate nel latte magro resistono per un minuto primo a 100° C, mentre vengono distrutte alla stessa temperatura in tre minuti primi.

Indolo. — Sono state allestite culture in brodo ed in acqua peptonata. Indolo è stato ricercato con il reattivo di Kovács ¹⁾ (paradimetilaminobenzaldeide, alcool amilico e acido cloridrico) dopo due e cinque giorni di incubazione a 45° C. Il brodo è stato preventivamente privato di zucchero facendovi sviluppare un ceppo del Bact. aerogenes (incapace di produrre indolo) e poi nuovamente sterilizzato. In tutti i casi la reazione fu nettamente negativa.

Catalasi. — Nelle provette della capacità di circa 20 cm³ sono state allestite le culture in latte magro contenutovi in ragione di 10 cm³ per provetta. Dopo 5 giorni di incubazione a 45° C si eseguiva la ricerca della catalasi nel seguente modo: nella stessa provetta la cultura veniva ener-

¹⁾ Kovács, N. - Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. Zeitschr. f. Imm. und Exp. Therap. 1928, 55, 311.

gicamente agitata dopo l'aggiunta di circa 5 cm³ di acqua per renderla ben liquida ed omogenea, poi si versava, sino a ricoprire quasi totalmente la provetta, l'acqua ossigenata al 3,6% (12 vol.), dopo una breve e rapida agitazione si chiudeva con un tappo di gomma forato portante un tubicino di vetro piegato ad S onde permettere sfuggire il liquido spostato dall'ossigeno formatosi nella provetta capovolta. Si è potuto constatare sempre che entro 10-15 minuti veniva liberato tanto ossigeno da riempire più di 4/5 della provetta.

Da quanto è stato esposto risulta che sin'ora non è stato descritto alcun germe avente i caratteri indicati. Si propone perciò la seguente denominazione: *Bacillus thermoacidificans*. Detto bacillo può essere classificato, seguendo Bergey, nel Genere: *Bacillus* (Cohn 1872). Famiglia: *Bacillaceae* (Fischer 1895) e Ordine: *Eubacteriales* (Buchanan 1917).

RIASSUNTO

Si descrive un bacillo lattico mobile e sporigeno isolato dal siero fermento del formaggio grana, che è da considerarsi, per la sua forma e per lo sviluppo ad alte temperature, un plectridio termofilo.

Il bacillo in parola produce acidità da numerosi zuccheri ed alcoli; acidità, che raggiunge nel latte magro 0,84% ed è dovuta quasi esclusivamente all'acido lattico.

Non essendo identificabile con nessuna altra specie sin'ora descritta, l'Autore propone la denominazione di *Bac. thermoacidificans*.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein beweglicher, sporogener Milchbazillus beschrieben, welcher aus dem Serumferment des Granakäses isoliert worden ist und der nach seiner Form und seiner Fähigkeit sich in Gegenwart hoher Temperaturen zu entwickeln, als ein thermophiles Plectridium anzusehen ist.

Aus mehreren Zuckerarten und Alkoholen bildet der in Frage kommende Bazillus Säuremengen die für Magermilch 0.84% betragen und fast ausschliesslich aus Milchsäure stammen. Da er mit keiner der bis jetzt beschriebenen Arten identifizierbar ist, schlägt Verf. die Benennung *Bac. thermoacidificans* vor.

Ulteriori rilievi sulla «Stanchezza» del terreno

Prof. Achille Grimaldi (Direttore inc.)

(Ricevuto il 20 aprile 1942-XX)

In una precedente nota ¹⁾, nella quale veniva esaminato l'andamento della produzione del trifoglio, dell'erba medica e della lupinella in un terreno della collina umbra che manifestava assai evidente il fenomeno della «stanchezza» nei confronti delle tre predette leguminose, facevo cenno a specifiche ricerche già predisposte per tentare di stabilire quali fossero le cause di quella stanchezza.

Poichè nel triennio che è trascorso alcune di tali ricerche sono venute a compimento ed il loro esito permette di orientare con minore incertezza le successive indagini, credo utile di riferire sui più interessanti risultati conclusivi.

Prove in vaso con terreno «stanco» sottoposto a trattamenti diversi

I risultati di grande interesse, e nello stesso tempo in discordanza tra loro, ottenuti da Mann (2) in Gran Bretagna e da Demolon e Dunez (3) in Francia nel corso delle ricerche sulla stanchezza mi hanno consigliato anzitutto di ripetere le prove di questi Autori. Come è noto, mentre il primo ottiene risultati apprezzabili nel diminuire la stanchezza ricorrendo all'impiego di larghe quantità di letame o al riscaldamento del terreno, i due studiosi francesi ascrivono la stanchezza del terreno nei confronti delle leguminose pratensi all'azione di un batteriofago che distrugge il *B. radicolica*. Quindi solo inoculando nel terreno stipiti di *B. radicolica* resistenti alla lisi si può curare la stanchezza.

Disgraziatamente le colture di *B. radicolica* e di batteriofago spediti da Demolon e Dunez sono giunte inutilizzabili per i danni subiti in viaggio e le circostanze politiche hanno poi impedito l'arrivo di altro materiale. D'altra parte non è stato possibile di isolare il batteriofago dal terreno umbro in cui si è manifestata la stanchezza perciò, anche alla luce dei risultati che verranno in seguito esposti, l'ipotesi di Demolon e Dunez non sembra applicabile al caso in esame.

Esito felice hanno sortito, invece, le prove compiute sulla falsariga di quelle già ricordate di Mann, opportunamente integrate con alcune altre. Il criterio direttivo che ha condotto l'esperienza era quello di precisare, se possibile, l'esistenza di qualche causa biologica determinante, esclusiva o principale, del fenomeno della stanchezza.

Le esperienze sono state compiute per un triennio in vasi del diametro di circa 30 cm. (superficie 7 decimetri quadrati) raggruppati in diversi lotti secondo il piano qui sotto esposto. La terra usata proveniva

dallo strato arabile dell'appezzamento già ricordato, assai stanco per il trifoglio.

A - controllo, terra stanca senza alcun trattamento.

B - concimazione azotata con solfato ammonico in ragione di 15 ql. ad ha. (gr. 10,5 per vaso).

C - concimazione con letame in ragione di 500 ql. ad ha. (gr. 350 per vaso).

D - trattamento con estratto di letame ottenuto lavando 350 gr. di stallatico con un litro d'acqua e spremendo la massa mediante torchiatura.

E - riscaldamento della terra umida a 70° per due ore.

F - inoculazione dei semi e del terreno con colture di B. radicola.

Un egual numero di semi di trifoglio venne seminato in tutti i vasi il 9 marzo 1939.

È superfluo aggiungere che le condizioni sperimentali si mantennero identiche in ogni vaso nel corso di tutto il triennio.

Fin dalla prima vegetazione, il lotto trattato con letame si è dimostrato superiore ai restanti per la vigoria di sviluppo; si distingueva, poi, il lotto trattato con estratto di letame.

Fin dal primo taglio del 1939 la produzione singola dei vasi e quella media del lotto sottoposto a letamazione è stata nettamente e di gran lunga superiore a quella di tutti gli altri.

In questa nota a carattere informativo non si riportano in dettaglio le produzioni di ogni vaso e per ogni taglio ottenuto nei tre anni.

Ciò è reso superfluo anche dall'uniforme ripetersi dei fatti fin dall'inizio della prova.

Il numero di piantine per vaso, all'inizio della prova equivalente nei diversi lotti, in seguito si è venuto differenziando, tanto che nel novembre del 1939 in media si contavano 44 piante per vaso nel controllo; 25 nel lotto letamato; 30 in quello trattato con estratto di letame; 29 nel lotto sottoposto a inoculazione col B. radicola; 28 in quello riscaldato e solo 8 in quello concimato con solfato ammonico.

Nel marzo 1942 il numero medio di piante per vaso era il seguente: più di 8 nei vasi sottoposti a riscaldamento; quasi 4 in quelli letamati; poco più di 2 in quelli trattati con estratto di letame; circa una e mezzo nel lotto azotato; una per vaso in quello inoculato con B. radicola e nemmeno 0,2 piante per vaso in media nel lotto di controllo.

Il prodotto medio in erba per vaso a seconda dei diversi trattamenti

Trattamento	Prodotto medio di erba per vaso			Totale del triennio
	1939 (3 tagli)	1940 (3 tagli)	1941 (3 tagli)	
Letame	166,5	187,-	159,5	513,-
Riscaldam. del terreno	22,7	107,4	287,5	417,7
Estratto di letame . .	81,-	69,8	123,1	273,9
Solfato ammonico . .	13,4	31,6	72,1	117,1
Inoculazione con B. radicola	19,-	12,7	64,7	96,4
Controllo	28,4	3,8	28,2	60,4

è riportato nella tabellina che segue, dove i lotti sono distribuiti in ordine decrescente di produzione:

Le differenze di produzione tra i singoli lotti sono così nette e così costanti che non vi è dubbio alcuno sulla varia efficacia dei diversi trattamenti.

È evidente che il letame e, in minor grado, l'estratto di letame hanno portato nel terreno dei fattori o delle modificazioni di efficacia notevole nell'eliminare o, almeno, nel ridurre il fenomeno della stanchezza.

Il riscaldamento, a sua volta, determina nel terreno, nei riguardi della produttività del trifoglio, effetti simili a quelli raggiunti dagli altri due trattamenti.

Assai modesta risulta invece, l'efficacia dell'azoto ammoniacale e pressochè nulla quella delle inoculazioni con *B. radiculicola*.

Tutto ciò permette di compiere qualche rilievo conclusivo che interessa il fine principale delle ricerche.

Resta anzitutto confermato quanto già si è detto nella nota precedente ¹⁾, che, cioè, nel terreno di Perugia il batteriofago non sembra la causa prima della stanchezza. Infatti il trattamento della terra stanca con letame o con estratto di letame non ha certo distrutto il batteriofago nè ha inoculato nel terreno degli stipiti di *B. radiculicola* resistenti alla lisi: semmai, può essere accaduto proprio il contrario. D'altro canto, l'effetto del calore simile a quello del letame può essere spiegato solo ammettendo che i due trattamenti abbiano arricchito il terreno di elementi nutritivi per il trifoglio: il letame con apporto diretto; il calore per effetto indiretto, in seguito alla solubilizzazione di principi minerali e all'attività della microflora decomponente che prende il sopravvento nel terreno riscaldato e che agisce in tal senso per via immediata e per via mediata.

La parziale efficacia dell'estratto di letame è dovuta all'incompleta asportazione degli elementi nutritivi a mezzo dell'acqua usata per il lavaggio dello stallatico stesso.

A parte qualsiasi considerazione sulla natura dei rapporti tra *B. radiculicola* e leguminose, l'impiego di una dose così cospicua di solfato ammonico come quella usata nel lotto B. avrebbe dovuto sortire una maggiore efficacia nel ridurre la stanchezza del terreno, se questa si dovesse imputare alla scomparsa del *B. radiculicola* per attacco da parte del batteriofago. Ciò anche quando la simbiosi di *B. radiculicola* e leguminosa non consistesse in una semplice fissazione d'azoto.

A questo proposito va ricordato che in recenti indagini americane (4) si è potuto triplicare il raccolto di erba medica con l'impiego di un concime azotato in un terreno contenente il batteriofago dove la resa aveva subito una forte flessione.

Anche l'inoculazione del seme e del terreno con colture di *B. radiculicola*, pure se fatta con stipiti non resistenti al batteriofago, avrebbe dovuto favorire assai di più all'inizio la vegetazione del trifoglio, fino a quando cioè la curva di sviluppo del principio litico non avesse raggiunto quella, in rapidissimo incremento iniziale, del bacillo tubercoligeno. Un fatto di questo genere, appunto, hanno potuto rilevare i citati Autori americani nell'erba medica.

Ma vi è un fatto che annulla ogni dubbio in proposito: nei vasi del lotto B., come in quelli degli altri lotti, le radici del trifoglio presentano i tubercoli caratteristici sviluppati in modo normale.

Si può concludere quindi che il triennio di prove ora terminato induce più a cercare l'origine della stanchezza in fenomeni di carenza che in fenomeni di origine biologica.

Su questa via ci indirizzano anche le prime ricerche, a cui ora accenneremo, sull'andamento della mortalità delle piante di trifoglio nel terreno stanco.

Ricerche sulla mortalità delle piante di trifoglio nel terreno stanco.

È superfluo rilevare che un elemento notevole, seppure fino ad oggi trascurato, nello studio della stanchezza del terreno è la conoscenza dell'andamento della mortalità delle piante durante il loro ciclo vegetativo.

I primi rilievi si iniziarono in un terreno indubbiamente stanco nel giugno 1939 sopra un trifoglio di un anno in piena produzione e vennero ripetuti di mese in mese. Senza riportare qui troppe cifre, dirò solo che il massimo di mortalità fu registrato nell'agosto (circa il 30 % delle piante). Nell'inverno successivo il prato venne rotto.

Dalla stessa primavera 1939 si seguirono le piantine di un trifoglio di nuova semina, riscontrando ancora il massimo di mortalità nei mesi di luglio e agosto (nel complesso oltre il 30 %). Poi durante tutto il resto dell'estate, nell'autunno, nell'inverno e nella primavera successiva (1940) le perdite si sono ridotte ad un minimo quasi trascurabile, per riprendere assai forti nell'agosto, con una seconda ondata di mortalità corrispondente ad un altro 30 % circa. Nell'autunno le perdite sono andate di nuovo diminuendo però nel complesso il trifoglio prima di essere rotto (febbraio 1942) presentava un numero di piante assai scarso: circa 1/5 di quelle esistenti nel giugno 1939.

Una terza prova nel corso del 1940-42 è stata compiuta in un'altra parcella. Su trifoglio di nuova semina vennero iniziati, con un certo ritardo, i primi rilievi nell'agosto del 1940.

La più alta mortalità dell'anno si ebbe nel settembre, però rimase contenuta in una percentuale assai modesta (12 %). Perdite minime nell'autunno, nell'inverno e nella primavera successiva; poi un improvviso e grave collasso nel luglio con la scomparsa del 65 % delle piante allora esistenti. Nell'agosto, del trifoglio rimanevano solo 1/4 dei cespi contati un anno prima.

Le osservazioni ora esposte confermano anzitutto alcuni rilievi già da tempo compiuti dagli agricoltori: la stanchezza si manifesta con un forte diradamento del prato che può iniziarsi fin dai primi mesi di vegetazione e che continua in modo da ridurre il periodo di sfruttamento della coltura. Però al diradamento si accompagna una produttività media delle piante restanti inferiore alla normale. Non ho eseguito finora dei rilievi specifici sulla resa in erba dei cespi di un prato stanco, ma insieme alle osservazioni sulla mortalità ne sono state fatte anche altre sullo stato vegetativo delle piante vitali: orbene, mentre all'inizio le piante in con-

dizioni buone e ottime raggiungevano oltre la metà del totale ,entro pochi mesi si dimezzavano di numero, fino a scomparire quasi del tutto al termine delle prove.

Le osservazioni pongono poi in rilievo che la scomparsa del trifoglio non è uniformemente distribuita lungo il suo ciclo vegetativo, ma si concentra per la maggior parte alla metà o al termine dell'estate. Le piante muoiono dopo aver compiuto lo sforzo produttivo, nel colmo o alla fine del periodo siccitoso (*) che a Perugia compromette assai spesso la vegetazione dei prati. È da supporre che l'avversità climatica determini l'annientamento delle piante che sono già indebolite dalla stanchezza.

Se questa interpretazione dei fatti è esatta, sembra di poter più agevolmente scorgere tra i possibili determinanti della stanchezza un fenomeno di carenza piuttosto che un'alterazione di equilibrio biologico.

La discordante percentuale di mortalità delle varie prove è connessa alle diverse condizioni di nascita e di successivo sviluppo del prato.

CONCLUSIONI

Le prove compiute nel triennio 1939-41 sottoponendo la terra « stanca » di Perugia a vari trattamenti ed i rilievi condotti nello stesso triennio sul decorso della mortalità delle piante di trifoglio in un terreno stanco permettono di affermare che la teoria di Demolon e Dunez sull'origine della stanchezza non è applicabile nel caso in esame.

Le stesse prove, invece, inducono ad inquadrare la stanchezza tra i fenomeni di carenza piuttosto che tra quelli di origine biologica. Su tale direttiva si sono già iniziate delle nuove indagini, tendenti a stabilire l'elemento o gli elementi che scarseggiano o mancano nel terreno stanco. Non è improbabile che tali elementi appartengano a quelli cosiddetti micronutritivi, conforme a un'ipotesi formulata da tempo e confermata da molte prove favorevoli.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Versuche welche im Laufe des Trienniums 1939-1941 an « müder » Erde von Perugia, die mehreren Behandlungen unterzogen wurde, ausgeführt worden sind, und die Bestimmungen über das in der gleichen Zeitdauer beobachtete Absterben der Kleepflanzen eines « müden » Erdbodens, berechtigen die Behauptung dass die Theorie von Demolon und Dunez über den Ursprung der « Müdigkeit » bei dem in Frage stehenden Fall nicht anwendbar ist.

Auf Grund dieser Versuche ist die « Müdigkeit » unter die Mangelserscheinungen eher als unter jene biologischen Ursprung einzureihen. In diesem Sinne sind neue Beobachtungen im Gange die den Nachweis erstre-

*) Le precipitazioni dei mesi estivi a Perugia sono state nel 1939 di mm. zero in luglio e mm. 86,6 in agosto, di cui 66,2 mm. caduti dopo il 20 del mese; nel 1940, mm. 44,8 in luglio e mm. 5,4 in agosto; nel 1941, mm. 1,8 in luglio e mm. 5,8 in agosto.

Ben welcher Bestandteil oder welche Bestandteile im « müdem » Erdboden fehlen oder spärlich vorhanden sind. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass jene Bestandteile zu den sogenannten Mikronährsubstanzen gehören, eine Hypothese die längst formuliert worden ist und bereits in vielen positiven Ergebnissen Bestätigung gefunden hat.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Grimaldi A.* – Rilievi sulla « stanchezza » del terreno per le leguminose pratensi. Nuovi Annali dell'Agricoltura. Roma, 1939.

(2) *Mann H. H.* – Investigations on Clover Sickness. The J. of Agricultural Science, XXVIII, part 3 (July, 1938)

(3) *Demolon A. et Dunez A.* – Bactériophage et fatigue des sols cultivés en luzerne. C. R. de l'Académie des Sciences, 197, 1933; 199, 1934; 202, 1936; 206, 1938; 208, 1939; 210, 1940.

Recherches sur la culture des légumineuses, Annales Agronomiques, 1940, 3.

(4) *Vandecaveye S. C., Fuller W. M. Katznelson H.* – Bacteriophage of Rhizobia in relation to symbiotic nitrogen fixation by Alfalfa. Soil Science, 1940, 50.

*“Con sette canne
si veste una donna,,*

LA

SNIA VISCOSA

dalle piantagioni di
canna di Torviscosa
trae la cellulosa no-
bile per la produzione
del raion e del fiocco

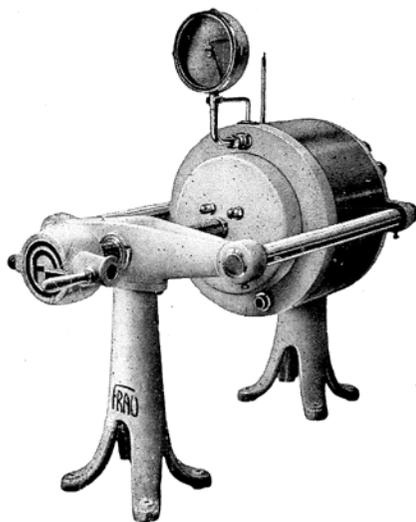
i due tessuti della nuova moda italiana

SNIA VISCOSA - Via Cernaia 8, MILANO

PASTORIZZATORE
STRATIFICATORE
RECUPERATORE
REFRIGERANTE PER LATTE

F R A U

THIENE



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

PRODOTTI PER L'AGRICOLTURA

CONCIMI CHIMICI

Perfosfato minerale dei vari titoli dal 14-16 % al 20-22 % di anidride fosforica, Perfosfato minerale granulato (17-19 %, 18-21 %), Perfosfato Trestelle, Perfosfato d'ossa, Solfato ammonico, Nitrato ammonico, Nitrato di calcio, Nitrato di soda, Fosfato biammonico.

ANTICRITTOGAMICI E INSETTICIDI

Solfato di rame 98-99 %, Zolfi di Romagna Trezza-Albani semplici e ramati. Anticrittogamico "M", Ramato P.I., Arilan (disinfettante delle sementi), Polvere Regina al 16 % di rame, Polvere del Diavolo (Fluosilicato di bario), Solfuro di carbonio, Solfato di ferro, Paradichlorobenzolo, Cartoni al betanastolo, ecc.. ecc.

"MONTECATINI"

SOC. GENERALE PER L'INDUSTRIA MINERARIA E CHIMICA
CAPITALE VERSATO LIRE 1.600.000.000

MILANO, VIA PRINCIPE UMBERTO 18

Filiali, Succursali, Agenzie, Rappresentanze in tutta Italia