

ANNALI DI MICROBIOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA ALLA
AGRICOLTURA ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI; DI
ENZIMOLOGIA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI NEI LORO RAPPORTI
CON LA MICROBIOLOGIA E LA BATTERIOLOGIA INDUSTRIALE

A CURA DEI PROFESSORI

T. CASTELLI, PERUGIA - G. DE ROSSI, PERUGIA - V. PEGLION, BOLOGNA
B. PEYRONEL, TORINO - R. PEROTTI, TORINO - I. POLITI, MILANO
P. RENCO, MILANO - S. RICCARDO, NAPOLI - M. SACCHETTI, BOLOGNA
O. VERONA, FIRENZE

DIRETTA DA
C. A R N A U D I MILANO

Dicembre 1947
Vol. III - Fasc. IV-VI

Segretario di Redazione
V. T R E C C A N I

DIREZIONE: VIA CELORIA, 2 - AMMINISTRAZIONE: VIA SALASCO, 4

M I L A N O

NORME DI COLLABORAZIONE

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

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

Agli Autori dei lavori originali vengono concesse non più di 16 pagine di stampa; il numero di pagine in più sarà a carico dell'Autore al puro costo di stampa. Le modificazioni tipografiche che non siano semplici correzioni di errori di composizione saranno addebitate agli Autori al 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 se-	
ettogrammo	= hg	decimetro	= dm	millim. quadr.	= mmq	condo	= sec
grammo	= g	centimetro	= cm				
decigrammo	= dg	millimetro	= mm	litro	= l	per cento	= %
centigrammo	= cg	micron	= μ	centim. cubo	= cc	per mille	= ‰
milligrammo	= mg			ora	= h	normale	= N
millesimo di						decimo norm	= 0, IN
grammo	= γ	metro quadr	= mq	minuto primo	= min	ph, Ph ecc.	= pH

Le formule chimiche devono essere scritte con gli indici in basso. Es. CaCl_2 .

SOMMARIO

	PAGINA
COMITATO REDAZIONALE - RIPRESA	114
O. VERONA - Sullo stato di fase di <i>Azotobacter chroococcus</i> Beij	115
P. RENCO - Ricerche sulla microflora del siero-fermento del formaggio grana	126
T. CASTELLI - Contributo alla conoscenza dei lieviti di alcuni formaggi	172
I. POLITI - C. COLLA - R. BENETTI - Ricerche sul metabol. glucid. dei lieviti	183
V. TRECCANI - C. COLLA - Ricerche su alcuni microbi del terreno ed att. oss.	198
E. CORBERI - Osservazioni sul comportamento del <i>P. Roqueforti</i> Thom in presenza di acido α aminovalerianico	206
C. E. MALAN - Apparecchiatura elettrica per sostituire il becco Bunsen o la lampada ad alcool nelle operazioni di isolamento e di trapianto dei microrganismi	214
C. E. MALAN - Conservaz. di preparati microbici con la vernice all'Acetilcellulosa M.	223
FORMISANO - La degradazione della cellulosa nel terreno agrario	226

Prezzo di Abbonamento per ogni volume (costituito di 6 fascicoli)

ITALIA L. 2000 - ESTERO L. 3000 - UN FASCICOLO SEPARATO L. 350

RIPRESA

Questo fascicolo conclude il volume III degli « Annali di Microbiologia ». Dopo quattro anni di interruzione dovuta agli avvenimenti bellici, riprendiamo la nostra iniziativa sollecitati dal desiderio di continuare l'opera intrapresa, e da numerose voci provenienti dagli Istituti universitari e dai Laboratori scientifici e tecnici. Esse ci incitavano a ridare vita ad un organo scientifico che consenta di poter rendere di pubblica ragione il frutto del lavoro sperimentale che, nonostante le molteplici difficoltà materiali del momento, ritorna ad affermarsi in virtù dello spirito di sacrificio che anima gli studiosi.

Sarebbe stato però vano ogni sforzo se non avessimo incontrato simpatia e comprensione da parte di numerosi Enti industriali che hanno generosamente contribuito a raccogliere i mezzi necessari all'impresa, ad essi portiamo il nostro vivo ringraziamento.

Lo spirito scientifico che va sempre più diffondendosi fra i tecnici delle nostre industrie e la sensazione avvertita largamente dai dirigenti delle industrie alimentari e fermentative circa la fondamentale importanza che il progresso scientifico presenta per la vita stessa della nostra industria, ci assicura che il loro appoggio non verrà a mancarci nemmeno nell'avvenire. Riprendiamo fiduciosamente il nostro lavoro che auguriamo risulti di qualche utilità al progresso ed alla affermazione della microbiologia italiana.

IL COMITATO REDAZIONALE

Sullo stato di fase di *Azotobacter chroococcum* Beij.

O. Verona

E' noto, fin dalle prime descrizioni, come le colonie superficiali di *Azotobacter chroococcum* Beij. si presentino sotto vari aspetti. Jones (1) ad es. studiando l'aspetto colturale di A. c. in agar di Ashby fissò i seguenti quattro tipi:

« 1. Young surface colonies (1-2 days) at 25° C., having been plated from active growing cultures not more than seven days old, are transparent, colorees, moist, slightly, convex, entire, round and about 1 mm. di. When one week old, colonies that are not thickly seeded may be from 1-2 cm. diameter, raised, convex, smooth, white, semi-opaque, moist-viscid, glistening, the masses having a tendency to flow, giving irregularity in outline with an entire edge. Increase in size usually ceases after two to three weeks and a brown pigment is slowly developed like streaky clouds within the viscid mass. As the culture dries with age, the surface becomes irregularly contoured with broad depressions.

« 2. Surface colonies and streak cultures on Ashbys agar are at first very similar to those of 1. Later, however, they differ in that they have only a slight tendency to flow over the surface of the medium, being firmer or more pasty, the growth accumulating in a raised mass, with the surface coarsely contoured, more or less concentrically.

« 3. Surface colonies and streak cultures differ from 1 e 2 in being drier and pasty rather than moist and not having any tendency to flow but developing with upright edges into a raised mass, deeply and closely contoured on surface in a rugose manner, often radiating from centre-cultures at first white, soon turning brown then black.

« 4. Surface colonies and streak cultures have a somewhat similar development to those of 3, but differ in being smaller, more, discreet, drier, frequently being cretaceous in texture, the surface becoming verrucose with fine indentations and the black pigment is produced earlier and is usually more intense ».

Nelle sue Memorie sulla Microbiologia del suolo Winogradsky (2), facendo uso di geli di silice distinse tre tipi di colonie : un tipo mucoso

(1) D. H. Jones: *A morphological and cultural study of some Azotobacter.* - « Centr. f. Bakt. », II Abt., vol. 38, p. 14, 1913.

(2) S. Winogradsky: *Étude sur la microbiologie du sol.* - II. Sur les microbes fixateurs d'azote, - « Ann. Inst. Pasteur », 40, 455, 1926.

(*colonies fluides*), uno secco e rugoso (*c. sèches*) ed uno mucoso-bombato e strutturato (*c. bombés*). Così, poco dopo, de Rossi (1).

Tale dualismo colturale, del resto continuamente confermato dalla comune pratica e fondamentalmente riferibile alle figure 1 e 3, 4 e 7 della Tav. I che accompagna il citato lavoro di Jones, dualismo che si estrinseca, peraltro, in maniere diverse in relazione anche alla formazione di pigmento, è certamente da porsi in rapporto allo stato di fase in cui si trova la specie nel momento in cui si procede al suo isolamento.

Quali siano tuttavia le caratteristiche di queste fasi non appare ben noto, per cui ci è sembrato di un qualche interesse procedere a qualche ricerca: sui risultati conseguiti qui brevemente si riferisce.

ISOLAMENTO DEI CEPPI

I ceppi sopra i quali sono state eseguite le presenti osservazioni sono stati isolati con il metodo di de Rossi che, come è noto, è inteso a sostituire il gelo di silice con l'agar. Tale metodo offre il vantaggio, rispetto a quello di Winogradsky, di una maggiore semplicità. Osservazioni, tuttavia, sono state effettuate anche su piastre al gelo pure presente quale sostanza energetica mannite. Il terreno proveniva da una parcella del campo sperimentale dell'Istituto. Le colonie sviluppatesi nelle varie serie di piastre erano ben riferibili ai tipi segnalati, in tutte le loro sfumature di aspetto, consistenza, mucosità, pigmentazione, ecc.; in altri termini, oltre a colonie in fase « S » e in fase « R » dichiarata, si rendevano visibili colonie in vario stadio di dissociazione (« SS-R », « S-R », « S-RR ») con prevalenza ora di uno ora di altro carattere dissociante.

Molte osservazioni furono effettuate direttamente; altre su colture trapiantate e mantenute su agar di Ashby. Per quanto si riferisce alla fase « R » le stesse osservazioni furono ripetute su varianti artificialmente provocate.

FATTORI STIMOLANTI LA DISSOCIAZIONE

Dal momento che nelle comuni piastre all'agar o al gelo mannitato compaiono promiscuamente colonie in vario stadio di dissociazione, è facile desumere come le singole cellule racchiudano già, al momento in cui si inizia il loro sviluppo colturale, elementi latenti di variazione. Quali, in Natura, siano i fattori di tale variazione difficile precisare in quanto si ha ragione di credere siano numerosi e complessi. In primo piano stanno, probabilmente, alcuni che potremmo dire nutrizionali, dipendenti cioè dalla natura e concentrazione della sorgente energetica.

Le varie prove eseguite consentono ad es. di indicare nei mezzi mannitati, glucosati o saccarosati i mezzi più adatti al mantenimento delle

(1) G. de Rossi: *La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. - I: Isolement et dénombrement des « Azotobacters »* - « Boll. Sez. It. d. Soc. Int. di Micr. », 4, 189, 1932.

forme in fase « S »; giacchè in tali mezzi non solo insorgono difficilmente, con il succedersi dei trapianti, fenomeni di variazione, ma gli stessi stipti in fase « R », originari o provocati, tendono a passare e poi a fissarsi in fase « S » dopo un certo numero di passaggi. Nei mezzi colturali influisce tuttavia la concentrazione del materiale energetico. Nell'agar di Ashby la mannite è presente, come è noto, nella quantità del 20 ‰. Ove tale quantità si porti al 30-40-50 ‰ e si insista nei passaggi le patine tendono a farsi meno mucose e a incresparsi ai bordi.

Sostanze diverse da quelle, come la mannite, classicamente impiegate non mancano di esercitare la loro azione. Ciò appare ben noto anche dagli studi di Winogradsky (1). Infatti, come è stato confermato, trapianti effettuati in piastre con alcool etilico danno patine che, pur mantenendosi mucose, si presentano meno abbondanti mentre morfologicamente le cellule si presentano più grandi e, spesso, in più frequenti forme involutive. In piastre al benzoato di sodio o di calcio si ha del pari uno sviluppo meno rigoglioso di colonie scarsamente mucose e secche; per esprimersi con le parole di Winogradsky: « le mucus n'y est pas si abondant, il n'y a plus de coulées, ni de confluences en flaques; il se fige plus vite et il brunit plus intensément ».

Quando si pensi che in Natura varie possono essere le sorgenti energetiche utilizzabili dagli azotobatteri chiaro è dunque di dover intanto attribuire ad esse, in quanto si dimostrano di influire sullo stato di fase, valore di fattore variante.

Del pari non si può disconoscere l'influenza delle sostanze azotate qualora esse siano presenti nel mezzo.

Culture in fase « S » trasportate e coltivate (sempre in agar di Ashby) in presenza di nitrato potassico e solfato ammonico 1-2-4‰ oppure di peptone 1-2‰ danno con il succedersi dei passaggi segni evidenti di dissociazione.

Non diverso è il comportamento di fronte alla reazione e il fatto si inquadra entro quanto è noto sulla biologia di altri microrganismi. Nelle prove cui si riferisce sono stati coltivati ceppi in fase « S » in liquido di Ashby a pH 6, pH 7, pH 8. Periodicamente (ogni 2-3 passaggi) venivano allestite colture su agar al fine di mettere in evidenza l'insorgere di fenomeni di variazione. Essi, in modo più o meno evidente, comparvero sia nelle colture costantemente propagate in mezzo acido, sia in colture propagate alternativamente in mezzo acido (pH 6) e in mezzo alcalino (pH 8). L'azione dei sali, per qualità e quantità, è probabilmente vasta. Positivi reperti sono stati da noi ottenuti per mezzo del cloruro di sodio e del cloruro di litio.

Numerosi sono quindi i fattori di variazione registrati (natura e concentrazione dell'alimento energetico, presenza o meno di composti azotati, concentrazione idrogenionica del mezzo, presenza di sali) o ritenuti possibili (azione della temperatura, essiccamento, ecc.) in vitro. Tali, se non maggiori, debbono essere in Natura accompagnandosi agli stimoli di ordine fisico o chimico anche quelli di ordine biologico per il determinarsi di azioni

(1) S. Winogradsky: *Étude sur la microbiologie du sol*. - V.^e *Mémoire*. - « Ann. Inst. Pasteur » 48, 89. 1932.

di antagonismo con altre specie microbiche queste agenti direttamente o indirettamente a mezzo dei loro elaborati. Noi stessi abbiamo osservato, a questo riguardo, come ad es. estratti colturali di liquidi fungini inducano frequenti variazioni in molti comuni microbi del suolo (1).

CARATTERI E STABILITA' DELLE FORME VARIATE

Anche se, come è stato detto all'inizio, i vari caratteri delle colonie consentono di riferire queste, fondamentalmente, ai due classici tipi « S » ed « R », numerosi possono essere i cambiamenti che si manifestano durante il processo di spostamento di fase; giacchè, oltre alla strutturazione delle colonie, entra in giuoco variamente interferendo la produzione di muco e la produzione di pigmento. Il fatto appare evidente, più che attraverso l'esame degli strisci effettuati consecutivamente su agar di Ashby, nelle colture su piastra. Infatti, partendo da una colonia « R » delle piastre di isolamento, ove si insista nei passaggi in agar di Ashby si passa più o meno velocemente senza notare aspetti intermedi ben definibili alla fase « S »: gli strisci si fanno meno pigmentati, più mucosi e, via via, più lisci fino ad assumere l'aspetto tipico della fase « S ». Qualche volta è stato osservato che il passaggio ad « S » si manifesta deciso fin al primo passaggio. Qualora invece si segua il succedersi delle generazioni mediante colture per disseminazione su piastra è più facile definire stadi di variazione intermedia. Valga ad es. quanto è risultato dalla esperienza riassunta nel seguente schema in cui:

A - colonie in tipica fase « R »

[non mucose (secche), rugose, finemente strutturate, intensamente pigmentate].

A.A. - colonie in fase « R-S »

[mucose e lisce al centro, strutturate agli orli, pigmentate].

A.A.A. - colonie in fase « R-S »

[non mucose (secche), rugose, non pigmentate].

AAAA - colonie in fase « R-S »

[mucose, debolmente strutturate, non intensamente pigmentate].

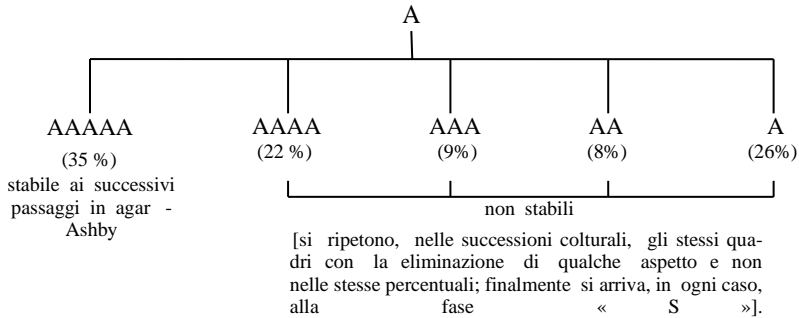
AAAAA - colonie in fase « S »

[mucose, lisce, scarsamente o tardivamente pigmentate].

Nello schema figurano le varie successioni colturali e sono indicate le percentuali di sviluppo; percentuali, peraltro, del tutto indicative alla singola esperienza perchè non riscontrate costanti:

(1) O. Verona: *Influenza di liquidi colturali fungini sullo sviluppo dei microbi del suolo.* - « Ann. d. Fac. Agraria dell'Università di Pisa, » 7, 147, 1946.

da colonia in fase « R » isolata
da piastre al gelo e disseminata
in piastre all'agar di Ashby



I fatti non differiscono, fondamentalmente, quando sotto lo stimolo di un fattore dissociante si passi dalla fase « S » alla fase « R ». Rimarchevole, in questi casi, la necessità di non abbandonare lo stimolo salvo un ritorno più o meno brusco alla fase di partenza.

Ebbene, quali caratteri morfologici e fisiologici fanno riscontro a questi vari aspetti colturali? L'indagine non si è estesa ai vari tipi segnalati, ma è stata condotta solo su ceppi in fase « S » e in fase « R » dichiarata: per questa sono state tuttavia effettuate osservazioni sia sulle colonie che tali si presentavano nelle colture di isolamento, sia su ceppi sperimentalmente variati.

Aspetto colturale. Per questo non c'è che da richiamarsi a quanto è stato detto. Si soggiunge peraltro che nei ceppi in fase « R » lo sviluppo appare più lento. Per quanto si riferisce alla produzione di muco sappiamo che essa è anche influenzata dalla natura del substrato oltre ad essere in rapporto con il cambiamento di fase. La presenza di composti proteici tende ad es. a farla aumentare (1); ma i fatti sono correlativi in quanto un turbamento del regime alimentare stimola, come si è visto, la comparsa dei fenomeni di variazione. In merito alla produzione di pigmento la minore o più lenta produzione nei ceppi in fase « S » è evidente. Si hanno purtuttavia casi in cui alla fase « R » non corrisponde agli altri caratteri variati quello di una maggiore pigmentazione. Si osservano cioè colonie tipicamente rugose, ma non pigmentate o pigmentate solo a settori.

Aspetto morfologico. Il complesso dei caratteri morfologici è fondamentalmente diverso nelle due fasi. Ciò che anzitutto emerge è la presenza o assenza dell'involucro mucoso.

In fase « S » tale capsula appare voluminosa, spesso racchiudente due o più elementi morfologici; in « R » è sottile o, più generalmente, assente. Presenza di capsula e formazione di muco nelle colture sono fatti correlativi.

Associazioni cellulari non tipiche si riscontrano spesso in fase « S » rivelando l'esame batterioscopico ammassi irregolari o, al più, cellule

(1) Halmilton: « Journ. of Bacteriology », 22, 1931.

disposte in corte catene; in fase « R » prevalgono invece raggruppamenti a tetradi o a sarcine. In quest'ultima fase si hanno anche più evidenti e numerose forme involutive. In fase « S » il movimento è più vivace; vero è anche che, in questa fase, le ciglia si mostrano assai più numerose e singolarmente più lunghe.

LA FISSAZIONE DELL'AZOTO IN RAPPORTO ALLO STATO DI FASE

Questo aspetto della questione è certo uno dei più importanti. Occorre però subito soggiungere che, almeno in rapporto alle esperienze eseguite, difficile è poter stabilire se la fissazione dell'azoto atmosferico si compia più intensamente in fase « S » o in fase « R ». Vale pertanto la pena, qui, di essere più dettagliati nella descrizione delle esperienze. Ecco come è stato proceduto.

Erlenmeyer da 1000 cc. contenenti 250 cc. di liquido di Beijerinck (conteneme, come è noto, 20 ‰ di mannite) furono seminate in numero di tre con un ceppo in fase « S », numero tre con materiale in fase « R » prelevato con una piastra di isolamento [R₁], e numero tre con un ceppo in fase « R » ottenuto mediante passaggi in agar di Ashby al cloruro di litio [R₂]. Fu incubato per 40 giorni a 24-25° C. Al termine del 40° giorno, proceduto alla determinazione dell'azoto per mezzo della kindalizzazione, risultò:

	<i>fase S</i>		<i>fase R₁</i>		<i>fase R₂</i>	
	mgr. di N fis- sato per 1000 di soluzione	mgr. di N fis- sato per gr. 1 materia energet.	mgr. di N fis- sato per 1000 di soluzione	mgr. di N fis- sato per gr. 1 materia energet.	mgr. di N fis- sato per 1000 di soluzione	mgr. di N fis- sato per gr. 1 materia energet.
prova n. 1	130	6,5	140	7	150	7,5
prova n. 2	155	7,7	138	7	145	7,2
prova n. 3	120	6,0	165	8,2	128	6,4
media	135	6,7	148	7,4	141	7,0

La media dei dati ottenuti lascerebbe pensare che in fase « R » la fissazione si compia in modo più attivo. Ma le differenze, peraltro, sono così tenui che un'affermazione in questo senso appare piuttosto azzardata; tanto più quando si considerino partitamente i singoli dati ora maggiori in « S », ora in « R ». Perché questo mancato deciso comportamento? Siccome siamo portati a ritenere che differenze nell'attività azotofissatrice pur debbono esistere in rapporto allo stato di fase, il motivo di questo incerto comportamento si pensa che debba risiedere in una certa instabilità dei caratteri di fase. Ciò ci fu dato di pensare in quanto, prelevata prima di procedere al dosaggio dell'azoto una piccolissima quantità delle vegetazioni apparse nei singoli matracci ed effettuate colture per disseminazione

su piastre allestite con agar di Ashby (e ciò allo scopo, appunto, di controllare la stabilità di fase) risultò la comparsa di colonie in fase « R » se pur in scarso numero, nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in fase « S » e viceversa.

Per questa ricerca il procedimento colturale seguito fu il seguente. Dopo aver ben agitato le diverse colture fu prelevato, con pipetta sterile, cc. 1 del materiale e diluito in cc. 1000 di acqua sterile. Agitato ripetutamente il recipiente di diluizione furono quindi allestite piastre inoculando di tale diluizione ciascuna di esse e in doppio cc. 0,5, cc. 0,2, cc. 0,1. A sviluppo avvenuto fu osservato:

- nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in S (medie):

colonie in S	82%
» » SR (AA)	2%
» » SR (AAAA)	4%
» » R	12%

- nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in R₁ (medie):

colonie in S	14 %
» » SR (AAA)	4 %
» » SR (AAAA)	6 %
» » R	76 %

- nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in R₂ (medie):

colonie in S	10 %
» » SR (AAAA)	28 %
» » R	62 %

Il fatto non destò eccessiva sorpresa in quanto venne a ripetersi il quadro, fatte salve le percentuali dimostratesi sempre incostanti, già fissato in precedenza.

Ad ogni modo là dove predominano forme in fase « R » il processo di fissazione sembra dimostrarsi più attivo; tuttavia ciò non consente, come già è stato detto, alcuna decisa affermazione al riguardo.

IN QUALE FASE SI RINVENGONO GLI AZOTOBATTERI IN NATURA?

Qualora fosse stato possibile dimostrare una netta non trascurabile differenza, nel potere di azotofissazione, tra le due fasi « S » ed « R », interesse avrebbe avuto la ricerca intesa a stabilire in quale stato di fase si rinvencono gli Azotobatteri nel terreno; giacchè, prevalendo l'una o l'altra fase, diversa sarebbe stata la valutazione della importanza da attribuire a queste forme nel quadro della fissazione biologica dell'azoto in Natura. Vero è che la

prevalenza o meno dell'una o dell'altra fase si vede correlativa alle condizioni in essere dell'habitat, del resto quanto mai mutevole nei suoi fattori variamente influenti.

D'altronde, ad una visione esatta circa la prevalenza della fase « S » o della fase « R » non è possibile giungere in quanto, nella valutazione in oggetto, influisce sensibilmente e variamente il substrato. Ci si richiama ai dati raccolti nella seguente tabella:

	N.º di Azotobatteri per gr. 1 di terra (piastre allestite con il metodo di de' Rossi) presenti:							
	mannite				benzoato di sodio			
	colonie S	colonie R	colonie SR	totale	colonie S	colonie R	colonie RS	totale
1. Terreno di medio impasto a coltura (Pisa)	1.520	460	420	2.400	1.180	490	950	2.620
2. T. argilloso a coltura (Pisa)	850	150	80	1.060	500	440	360	1.300
3. T. a riposo tendente all'argilloso (Pisa)	540	190	160	890	370	80	510	960
4. T. di medio impasto, prativo (Firenze)	1.050	150	70	1.370	620	190	400	1.210

Si scorge da tali dati che, ove si impieghi mannite, la prevalenza è per le forme in fase « S »; ove si impieghi invece benzoato di sodio la prevalenza non sempre è per tale fase: si modificano comunque i rapporti. Quale, delle due serie di dati, ci rappresenta l'aspetto reale? Ed inoltre: le colonie per es. repertate in fase « R » nelle piastre al benzoato di sodio è in tale fase che si trovavano in natura, oppure tali si sono manifestate nel singolare ambiente di isolamento? Difficile è dire.

CONCLUSIONI E DEDUZIONI

Le ricerche cui si è sommariamente riferito pongono in rilievo come il dualismo e, a volte, la pluralità di aspetto colturale registrata fin dalle prime descrizioni in *Azotobacter chroococcum* debba riportarsi al vario stato di fase ed inquadarsi pertanto nel vasto fenomeno della dissociazione microbica.

Pur attraverso tipi diversi si individuano in modo ben netto le due fasi « S » ed « R » già note in numerosi altri microrganismi. L'una e l'altra fase risultano molto bene definite da un complesso di caratteri colturali e morfologici i principali dei quali, riassuntivamente, sono:

fase « S »

- colonie lisce, bombate, mucose, subtrasparenti, di più rapido sviluppo, meno intensamente pigmentate, facilmente confluenti;
- abbondante produzione di muco;
- presenza di capsula più o meno voluminosa;
- mobilità vivace; ciglia più numerose e più lunghe;
- ammassi cellulari irregolari o corte catene;
- meno frequenti forme involutive;
- meno intensa o più lenta formazione di pigmento;
- minore resistenza agli antisettici;
- probabile minore attività azotofissatrice.

fase « R »

- colonie circolari variamente strutturate, con aspetto di rosetta, secche, non mucose, opache, di più lento sviluppo, più intensamente pigmentate, con tendenza a rimanere isolate.
- In altri casi le colonie assumono aspetto intermedio. Se ne hanno di mucose pur presentanti lievi strutturazioni; altre, mucose al centro, presentano strutturazioni radiali agli orli; altre, rugose e secche, non presentano pigmento o lo presentano solo in corrispondenza di limitati settori.
- scarsa o assente produzione di muco;
- assenza di capsula;
- più lenta mobilità; ciglia meno numerose e più corte;
- ammassi cellulari a tetradì o a sarcine;
- più frequenti forme involutive;
- maggiore produzione di pigmento nelle varianti pigmentate;
- maggiore resistenza agli antisettici;
- probabile maggiore attività azotofissatrice.

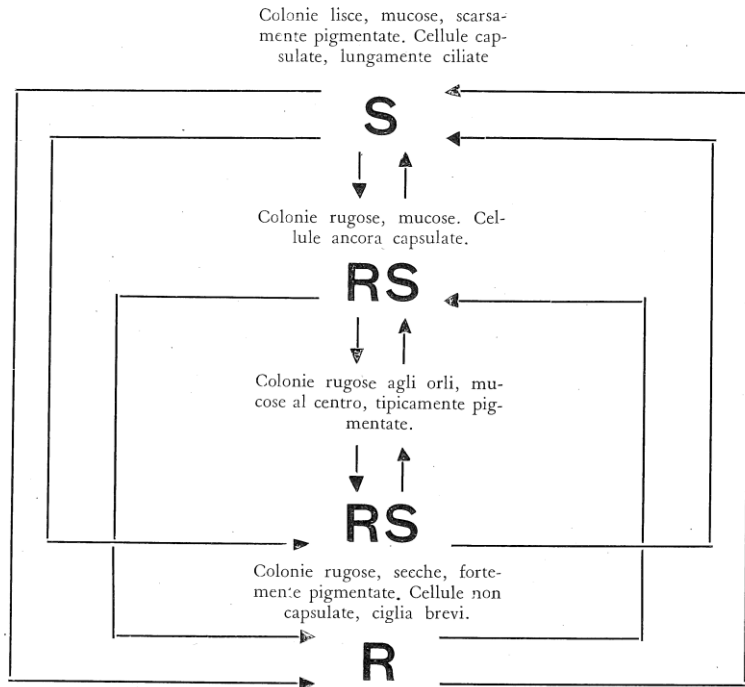
Ciò stabilito risulta chiaro come le varietà che alcuni Autori hanno distinto in seno alla specie, non sono che semplici aspetti dello stato di fase. Le varietà ad es. capsulate e non capsulate di Jones corrispondono, evidentemente, alla fase « S » e alla fase « R ». Del resto, revisioni fatte, sotto questo punto di vista, di altre specie microbiche hanno portato ad analoghe conclusioni. E' recente, al riguardo, uno studio di Puntoni (1) su *Bact. bulgaricum* del quale anche, per lo addietro, vennero distinte varietà oggi dimostrate essere il risultato di fenomeni dissociativi.

Forse, al lume di queste acquisizioni, cadrebbe opportuno rivedere non solo le diverse varietà, ma anche le varie specie o per lo meno quelle specie che hanno caratteri molto simili tra loro. C'è forte motivo di credere, ad es. che, *Azot Vinelandi* isolato da terre americane di Lipman null'altro rappresenti che uno stato di fase di *Azot. agile* al quale, d'altronde, anche secondo Löhnis, e Westermann (2) dovrebbe riferirsi.

(1) V. Puntoni: *Dissociazioni del bacillo bulgaro*. - « Ann. Micr. », 2, 121, 1942.

(2) F. Löhnis e T. Westermann: *Ueber stickstofffixierende Bakterien*. - « Centr. f. Bakt. », II, 22, 234, 1909 [questo ravvicinamento è peraltro discusso da Winogradsky in quanto in *Az. Vinelandi*, a differenza di *Az. agile*, si ha con il tempo una riduzione dimensionale degli elementi morfologici e un loro deciso incistamento].

Finalmente, la variabilità culturale e morfologica presentata da *Azotob. chroococcum* richiama latamente i vari cicli di sviluppo che sono stati elaborati per questa specie da Löhnis e Smith (1), da Petschenko (2) e, forse, da altri. Noi, pur senza entrare in merito alla questione, premesso tuttavia che non siamo portati a condividere l'opinione di Löhnis e degli altri, ammettiamo solo possibile un ciclo culturale con talvolta corrispondenti, ma non sensibilmente diversi aspetti morfologici:



Tale ciclo può svolgersi in un senso oppure in un altro; è comunque e semplicemente un ciclo trasformativo del tutto dipendente o in gran

(1) F. Löhnis e N. R. Smith: *Life cycles of the Bacteria.* - « Jour. of Agr. Res. », 6, 675, 1916.

(2) B. v. Petschenko: *Ueber die Biologie, die Morphologie und den Entwicklungszyklus von Mikroorganismen der Azotobactergruppe.* - « Centr. f. Bakt. », II, 80, 161, 1930.

parte dipendente da stimoli esterni (non conoscendosi la natura e il valore degli stimoli interni) e pertanto non riferibile al complesso e dubbio quadro della ciclogenesi (1).

RIASSUNTO

L'A. si sofferma nella descrizione dei vari aspetti colturali presentati da *Azotobacter chroococcum* Beij. Egli ritiene che tali aspetti altro non siano che manifestazioni dello stato di fase dimostratosi variare in rapporto a diversi fattori. Appare in conseguenza dubbia la definizione di particolari varietà e forse, sotto questo punto di vista, meritano anche di essere riviste alcune specie ritenute distinte da *Azot. chroococcum*.

RESUMÉ

L'Auteur, en se référant à des observations précédentes, s'arrête à décrire les divers aspects culturels présentés par *Azotobacter chroococcum*. Il retient que ces aspects ne sont que des manifestations de l'état de phase qui c'est démontré variable par rapport à plusieurs facteurs. Ces facteurs de variation ont été individués dans la nature et la concentration de l'aliment énergétique, dans la présence ou l'absence de substances azotées, dans la variation de concentration des ions hydrogène, dans la présence de sels, etc., y compris des stimulations d'ordre biologique. Vient ensuite la description des deux phases « S » et « R » et enfin quelques considérations sur la valeur à attribuer à ces deux phases par rapport à la fixation de l'azote.

*Dall'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica
dell'Università di Pisa*

(Pervenuto in redazione il 20-1-47).

(1) Un ciclo di natura genetica potrebbe forse ammettersi, ove fosse definitivamente dimostrata l'esistenza di forme filtrabili, limitatamente al passaggio dalla forma visibile alla forma invisibile. Vero è che nulla sappiamo circa il valore e significato genetico della fase filtrabile. D'altra parte sulla esistenza di tali forme filtrabili vertono discussioni nonostante positivi reperti registrati da Riccardo.

Cfr. Novogroudsky D. M. e M. Messineva: *The invisible forms of Soil Bacteria*. « Microbiology », vol. III, 1934 (cit. da Riccardo).

Novogroudsky D. M.: rec. in « Bull. Inst. Pasteur » 35, 937, 1937.

Riccardo S.: *Lo studio della microflora terricola insediatasi sulle lave vesuviane del 1895-1899*. - « Ann. Micr. », 2, 135, 1942.

Ricerche sulla microflora del siero-fermento del formaggio grana

IMPORTANZA DEL SIERO-FERMENTO NELLA FABBRICAZIONE DEL FORMAGGIO GRANA E STUDI RIGUARDANTI IL SUO CONTENUTO MICROBICO

Paolo Renco

I. - Batteri del genere "Thermobacterium" Orla Jensen

Per siero-fermento o siero innesto s'intende il siero fermentato proveniente dalla lavorazione del grana, lasciato inacidire in speciali recipienti in modo da raggiungere, entro 20-22 ore circa, un dato grado di acidità, richiesta per la buona riuscita del formaggio.

Il siero-fermento, che ha fondamentale importanza nella fabbricazione del grana, viene aggiunto al latte in caldaia all'inizio della lavorazione. Se ben riuscito, presenta un'acidità che varia da circa 28 a 60° S.H. secondo il caseificio (oggi, generalmente, vengono superati i 40° S.H. e si lavora di preferenza con sieri fermenti di 50-56° S.H.) e può considerarsi come una cultura di fermenti lattici (che vi si trovano in ragione di parecchie centinaia di milioni per cc. superando non di rado il miliardo).

Il siero-fermento viene aggiunto, al latte in caldaia in ragione di tre litri circa per ogni 100 litri di latte. Questo forte innesto porta il numero dei microbi del latte in caldaia da un paio a qualche diecina di milioni, carica che risulta, per conseguenza, rappresentata essenzialmente dai termobatteri. In seguito le operazioni tecnologiche, applicate nella fabbricazione del grana, favoriscono in modo tale lo sviluppo di questi batteri da far loro prendere nel formaggio fresco una assoluta predominanza.

L'uso del siero-fermento è stato introdotto per la prima volta nella fabbricazione del formaggio grana verso il 1890, dopo alcuni anni di esperimenti fatti dal capo cascinaio Giuseppe Notari (1) (al quale va il principale merito per la sua diffusione e uso razionale), ma la prima pubblicazione in merito, si deve a P. Spallanzani (2) nel 1895. L'A. nell'intento di com-

(1) Giuseppe Notari - Stab. Tipograf. Artigianelli in Reggio E., 1937.

(2) P. Spallanzani: *L'inoculazione del siero-fermentato nella fabbricazione del grana. Le stazioni sperimentali agrarie italiane* - 1895, Vol. XXVIII, pag. 43.

battere il gonfiore, si era proposto di innestare il latte in caldaia con buoni fermenti lattici presenti nel siero di una lavorazione ben riuscita. Le prime prove furono eseguite con siero-fermento avente un'acidità di 13° S.H., acidità che però veniva parzialmente neutralizzata prima di aggiungere il siero nel latte in ragione del 5 %. I risultati furono realmente eccellenti, ma l'A., pur affermando che si tratta di una cultura di fermenti lattici purificati e selezionati, non fa cenno alle forme o specie microbiche presenti.

Nel 1905 il Fascetti riprendeva l'argomento con uno studio sistematico sulla natura, sulle funzioni, sulla flora microbica, sui criteri per la conservazione, controllo ed uso del siero-fermento. Il Fascetti giunse alla conclusione che il supremo fattore direttivo della fabbricazione del grana è il grado di acidità.

Quest'ultima può essere opportunamente regolata coll'aggiunta razionale del siero-fermento. Ma il siero-fermento, scrive il Pascetti (1), ha una funzione eminentemente fermentativa, sia influenzando la flora microbica durante la lavorazione, sia preparando l'ambiente chimico adatto nel formaggio perchè si inizi il regolare processo fermentativo.

L'A. ha studiato il siero-fermento soprattutto dal punto di vista tecnologico mentre, della sua composizione microbiologica, si è limitato a constatare che « il latte-siero residuo della fabbricazione del grana ben riuscito, tenuto alla temperatura di 30° C. per circa 20 ore, presenta sempre in predominio due forme di fermenti lattici: una varietà del *Bacterium lactis acidi* del Leichmann ed un bacillo lattico acidificante. A seconda della temperatura e della carica batterica che presenta il siero, appena fabbricato il formaggio, della forma del recipiente ove il siero si conserva e della durata del riposo, varia fortemente il numero dei microbi ed anche la proporzione delle due forme microbiche suaccennate, come il grado di acidità ». L'A. prosegue affermando che: « i migliori effetti del siero razionale fermentato e controllato si ottennero quando la proporzione dei due fermenti era pressochè uguale e quando l'acidità misurava da 12 a 13 gradi Soxhlet ». Le forme streptococciche predominano quando l'acidità è più bassa di 12-13° S.H., le bacillari quando è più alta.

Il Pascetti ha dimostrato che, coll'uso razionale di siero-fermento, si può prevenire in grandissima parte la comparsa dei difetti del formaggio grana, ottenendo nello stesso tempo un più regolare andamento maturativo.

In seguito agli studi suaccennati, l'uso del siero-fermento nella fabbricazione del grana si diffuse rapidamente ed oggi è universalmente adottato (2).

Qualche accenno nei riguardi della flora microbica del siero-fermento è fatto da Della Torre in uno studio sulla flora microbica del siero fresco (3)

(1) G. Fascetti: *Caseificio* - Manuale Hoepli, 1918.

(2) E' bene ricordare che prima dell'entrata in pratica l'uso del siero-fermento, si riteneva ben riuscita una partita di grana avente 50/60 % di « scelto », mentre dopo l'introduzione del siero-fermento lo scelto deve presentare non meno del 90 %.

(3) G. Dalla Torre: *La flora microbica del siero di formaggio grana*. - Annuario della R. Stazione Sperimentale di Caseificio di Lodi, 1919, pag. 59.

ed in un altro sulla flora microbica del formaggio grana (r). Nel primo lavoro, l'A. constata che la flora microbica del siero fresco è composta sostanzialmente dagli streptococchi, mentre i bastoncini sono piuttosto rari; nel siero-fermento invece predominano i bastoncini. Questi ultimi vengono divisi dall'A. in due gruppi: coagulanti (sicuramente rappresentati dai generi *Thermobacterium* o *Streptobacterium*, Orla Jensen) e gassogeno-coagulanti descritti dallo stesso A. in un altro lavoro (2).

Nello studio che tratta il contenuto microbico del grana l'A. si occupa brevemente della microflora di due campioni di siero-fermento. In uno dei campioni (acidità 34° S.H.), l'A. ha riscontrato 12.600.000 germi per cc., rappresentati nella maggior parte dai bastoncini lattici e principalmente da batteri simili al *Thermobacterium helveticum* ed allo *Streptobacterium casei*; nell'altro campione (ac. 28,6° S.H.), ha contato 13.090.000 germi per cc. rappresentati sostanzialmente (13.000.000) da bastoncini lattici coagulanti e da batteri gassogeno-coagulanti. L'A. si limita alle suddette constatazioni senza mettere in rilievo i caratteri dei ceppi isolati.

Da quanto è stato esposto, risulta che il siero-fermento rappresenta uno dei principali fattori per la riuscita fabbricazione del grana e che la sua importanza consiste nell'apporto dell'acidità e dei microrganismi che servono a combattere i principali difetti, tra i quali - in primissimo luogo - il gonfiore e che concorrono alla maturazione del formaggio. Ora i suddetti microbi non sono stati studiati sinora che assai superficialmente (lo scrivente non ha trovato altri lavori oltre a quelli sopracitati) oppure indicati solamente con nomi di determinate specie, nomi insufficienti a precisare le loro caratteristiche, tenendo conto particolarmente di notevoli varietà di ceppi appartenenti alle specie del genere *Thermobacterium* Orla Jensen.

Lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere i caratteri dei microbi predominanti nel siero-fermento, onde poter vedere - in seguito - l'influenza delle singole specie sulla preparazione del siero-fermento, sulla fabbricazione e sulla maturazione del formaggio grana.

Siccome, dall'esame di numerosi campioni di sierofermento, si è potuto constatare nella totalità dei casi l'assoluta predominanza dei bastoncini lattici appartenenti al genere *Thermobacterium*, la prima parte del lavoro è stata dedicata ai ceppi appartenenti al genere sopraindicato.

(1) G. Dalla Torre: *Sul contenuto microbico del grana durante la maturazione*. Annali dell'Istituto Caseario Zootecnico pel Mezzogiorno in Caserta, Vol. II, 1939, pag. 109.

(2) G. Dalla Torre: *Fermentazioni anormali del grana*. - Annali dell'Istituto Sperimentale di Caseificio di Lodi, 1925, fasc. 3-4.

Medicazione
Disinfezione
Deodorazione

A M U C H I N A

(Reg. Min. Int. 100/42)

Medicamento disinfettante istofilo ad uso umano

AMUCHINA "Z,"

(Reg. Min. Int. 100/43)

Medicamento disinfettante istofilo ad uso veterinario

ANTISAPRIL

(Reg. Min. Int. 99/41)

Disinfettante deodorante grezzo

LISICERINA

(Reg. Min. Int. 424)

Disinfettante antiaftoso

"C. L.",

Per disinfezione e detersione delle bottiglie del latte

AMUCHINA Soc. p. Az.

Sede: GENOVA - Via B Bosco, 37 - Telefono 55.357 - 53-723

Stabilimenti: SAMPIERDARENA - Via Pacinotti, 86 - Tel. 2-051

MILANO - Viale Umbria, 18 - Telefono 54-457

La razionale fabbricazione del formaggio esige che il caglio sia accuratamente controllato e con titolo costante.

A queste esigenze risponde

C. MOTTA & C. - MONZA

VIA CAIROLI 2a - TELEFONO 4613 - Casa Fond. nel 1926

Fabbrica monzese di caglio e coloranti per burro e formaggi.



FABBRICA PRODOTTI CHIMICI

Dott. V. SACCO

MILANO

VIA FILIPPO BALDINUCCI, 51 - TEL. 97-254

Il "Neomoscan,, ideato presso l'Istituto Sperimentale di Lattieria in Kiel, è l'UNICO prodotto che ha un potere DETERGENTE 3 volte superiore alla soda, unisce una attività BATTERICIDA 5 volte maggiore dell'acido fenico, offre una perfetta COMPATIBILITA' col latte e coi latticini, nonché una ASSOLUTA INNOCUITA' su metalli, legno e gomma.

Il "Neomoscan,, brevettato in 19 paesi del mondo, ha dimostrato nella pratica industriale:

- 1 di realizzare la pulizia e la disinfezione dei recipienti e delle macchine con un'ECONOMIA del 50% sui vecchi sistemi, riducendo fortemente le spese di combustibile, mano d'opera, spazzole, ecc.
- 2 di contribuire in modo efficacissimo alla IGIENICITA' del latte, al MIGLIORAMENTO dei prodotti caseari e alla buona MANUTENZIONE degli impianti.

2. - Le caratteristiche dei fermenti lattici del genere “*Thermobacterium*” Orla Jensen (1)

a) *Forme di termobatteri.*

I bastoncini appartenenti al genere *Thermobacterium* si presentano sotto varie forme, talvolta regolari, talvolta più o meno irregolari, forme che, in gran parte, dipendono dalla composizione dei terreni nutritivi e dallo stato di anaerobiosi.

Salvo qualche eccezione, si può affermare che non esistono sostanziali differenze tra i ceppi ed anche tra le specie stesse.

Nei terreni liquidi i termobatteri si presentano per lo più sotto forma di bastoncini di spessore vario, talvolta tozzi, talvolta sottili, dritti o ricurvi, isolati o riuniti due a due, spesso in lunghissimi filamenti. Mentre nei terreni agarizzati, oltre a forme regolari, si possano osservare spesso quelle ipertrofiche: bastoncini attorcigliati irregolarmente od a forma di anello, oppure rigonfi a forma di erre.

Orla Jensen scrive, nella sua fondamentale pubblicazione, che i termobatteri si presentano sotto forma di lunghi bastoncini con la tendenza a formare filamenti e non di rado strane aricciature; questi filamenti risultano composti da parecchi segmenti che si possono mettere in evidenza solo con i preparati allestiti con il balsamo di Canada e non coll'acqua.

Nelle culture giovani e vigorose si riscontrano per lo più bastoncini isolati o riuniti due a due. Nelle culture ottenute per striscio, se in largo contatto coll'ossigeno dell'aria, danno luogo a forme irregolari.

Generalmente presentano granuli di volutina che si possono mettere in evidenza con le colorazioni a base di bleu di metilene.

In alcuni ceppi, i granuli si riscontrano solo nei bastoncini giovani, mentre in altri nelle cellule di 2-3 giorni.

I termobatteri hanno per lo più uno spessore superiore di un micron; nelle culture vecchie si riscontrano forme rigonfiate o comunque involutive.

Henneberg (2) trova che i termobatteri presentano varie forme secondo i mezzi di coltura adoperati. Il *Tbm. lactis* si presenta nel latte spesso anche sotto forma di filamenti straordinariamente lunghi (23-300 x 0,7 μ), mentre, nelle culture in agar, si trovano lunghi bastoncini di forma normale, raramente ricurvi ed attorcigliati a forma di anello.

Nei terreni liquidi i bastoncini sono generalmente dritti, isolati o uniti due a due o tre a tre (6 x 0,7 μ o 2,8 x 0,7 μ).

Descrivendo in seguito i termobatteri dello jogurt, *Tbm. jugurt* e *Tbm. bulgaricum*, nonché il *Tbm. helveticum*, trova che le forme di questi sono pressochè uguali a quelle del *Tbm. lactis*.

(1) Il lavoro fondamentale di S. Orla Jensen riguardante la classificazione dei fermenti lattici « *The lactic acid bacteria* », è uscito in seconda edizione a Copenaghen a cura di « Mémoires de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark » nel 1942. Nel 1943 è stato pubblicato un complemento.

(2) Henneberg W.: *Handbuch der Gärungs bakteriologie* - II B., 1926.

Secondo Meubrink (1), il *Tbm. lactis* si presenta, nei terreni liquidi, sotto forma di bastoncini sottili o robusti, lunghi o corti, in genere di forma regolare, raramente un po' ricurvi ed assai spesso, particolarmente nel siero e nel latte, in lunghe catene. Sull'agar le forme sono irregolari, spesso unite in catene o in filamenti attorcigliati.

Il *Tbm. helveticum* e *Tbm. Bulgaricum* si differenzierebbero dal precedente per la tendenza a formare bastoncini assai lunghi e sottili, nonchè attorcigliati; nei terreni contenenti il peptone formano lunghe catene.

Demeter e Schmid (2) trovano che i termobatteri presentano al microscopio diverse forme; in parte sono corti bastoncini uniti due a due, in parte lunghi robusti bastoncini isolati o riuniti in lunghi filamenti e catene. Quest'ultima forma è particolarmente frequente nelle culture a tratti di penna.

Alcuni ceppi presentano, nelle culture a tratti di penna nell'agar sieropeptone, lunghe cellule in parte arrotolate, in parte rigonfie a forma di bollicine. Questi ceppi dimostrano sempre la capacità di fermentare il saccarosio e producono molto muco nel latte tornasolato.

Karnicki e Dörner (3) danno, in uno dei loro lavori, la seguente descrizione delle forme batteriche. Sette ceppi di termobatteri, classificati come *Tbm. helveticum*, prelevati dalle colonie ottenute con striscio in anaerobiosi (chiusura Burri) su agar siero-peptone, si presentavano come bastoncini isolati, raramente due a due e spesso diramati (verzweigt) delle dimensioni di $1.7 - 12 \times 0,8 - 1 \mu$, un ceppo sotto forma di bastoncini isolati regolarmente con gli estremi arrotondati relativamente corti e grossi (spessore $0,9 \times 1,3 \mu$) od un altro ceppo come bastoncino isolato, raramente a due a due abbastanza regolare ($3,5-7 \times 0,6-0,9 \mu$).

Gli undici ceppi, descritti come appartenenti al *Tbm. lactis*, presentavano forme alquanto diverse; alcuni si presentavano sotto forma di sottili bastoncini ($d = 0,7$) isolati od in filamenti irregolari, altri come bastoncini di forma regolare isolati due a due o in brevi catene, oppure come sottili bastoncini ($0,5-0,6 \mu$) isolati e regolari, altri ancora molto sottili ($0,4 \mu$) bastoncini ($0,5-0,6 \mu$) isolati e regolari, altri ancora molto sottili ($0,4 \mu$) riuniti in catene ricurve, altri ancora in catene irregolari e con notevole spessore ($2,5 \mu$).

Le catene ed i filamenti si trovano quasi sempre gli uni accanto agli altri. Il quadro microscopico viene fortemente influenzato dalla presenza dell'ossigeno, in quanto la formazione di catene, si ha talvolta solo in anaerobiosi mentre, in presenza dell'ossigeno, queste non si sviluppano. Altrettanto variano, secondo la presenza dell'ossigeno, lo spessore e la conformazione regolare.

(1) Meubrink: «Milchw. Forsch.», 1928, Vol. 6, pag. 187.

(2) Demetr K. I. e A. Schmid: *Über das Verhalten der einzelnen Milchsäurebakteriengruppen bei Emmentaler Käsen.* - Milchw. Forsch., 1936, Vol. 17, pag. 270.

(3) Karnicki F. e W. Dörner: *Die Milchsäurebakterienflora der in der schweizerischen Käseerei üblichsten Lab und Kulturarten.* - «Landw. Jahrbuch der Schweiz», 1934.

Burri e Kollmann (1) trovano che il *Tbm. helveticum* e *Tbm. lactis* hanno forme nettamente distinte, in modo che l'esame microscopico dei singoli ceppi, tenendo presente anche la forma delle colonie, può portare un sostanziale contributo alla classificazione.

Comune a tutti i bastoncini appartenenti al *Tbm. helveticum* è una certa lucentezza e pronunciata rifrangenza, mentre la lunghezza è assai varia; alcuni ceppi sono rappresentati solo da corti e tozzi bastoncini, altri solo da lunghi od altri ancora di forme lunghe e torte. Lo spessore è per lo più regolare e quasi sempre supera un micron. Generalmente i bastoncini sono lineari e diritti con estremi poco arrotondati. Il *Tbm. Lactis* invece si presenta sotto forma di bastoncini contorti, piuttosto snelli, cioè relativamente sottili rispetto la lunghezza ed assai poco rifrangenti la luce. Dette forme si riscontrano nelle grosse ed opache colonie prive di struttura. Negli altri tipi di colonie, le forme possono subire delle oscillazioni; si possono avere bastoncini ricurvi, ma grossi; oppure molto lunghi o sotto forma di filamenti per nulla ritorti.

Tutti i termobatteri isolati da Kantardjieff (2) dallo jogurt, dal caglio naturale, dalle culture usate nella fabbricazione dell'emmental presentano nelle colonie, particolarmente se sviluppati alle temp. ottime, forme pressochè uguali; cioè bastoncini spesso ritorti a forma di anello. Un ceppo capace di fermentare saccarosio si presentava ad una estremità ramificato. Nelle culture in latte e brodo zuccherato, tutti i ceppi presentano bastoncini regolari con più o meno spiccata tendenza per la formazione delle catene che arrivano sino a 200 μ .

b) *Forma delle colonie.*

Secondo Burri e Kollmann (3) il *Tbm. Lactis* presenta sei tipi di colonie, probabilmente dovute alla spiccata tendenza di questo germe alla dissociazione.

- c) Colonie di medie dimensioni membranose, sottili a forma di disco rotondanti.
- b) Colonie relativamente piccole, od anche grosse a cosiddetta forma di anello, cioè colonie aventi un disco centrale di struttura poco appariscente e con margine a pieghe ispessito e senza struttura.
- e) Colonie di medie dimensioni membranose, sottili a forma di disco rotonde, in trasparenza di colore grigio-verdognolo, di struttura finemente cristallina, ossia sabbiosa.
- d) Uguali alle precedenti, però senza il margine rotondo, ma lobate, con o senza le pieghe del margine.

(1) Burri R. e Kollmann. H.: *Studien über die Gattung Thermobacterium (Orla Jensen) mit besonderer Berücksichtigung der Säurungsflora des jungen Emmentaler Käses* - «Landw. Jahrbuch der Schweiz», 1941.

(2) Kantardjieff A. - *Untersuchungen über echte Milchsäurelangstabchen* - «Milchw. Forsch.», 1929, Vol. 7, pag. 171.

(3) Burri e Kolmann: loco cit.

- e) Colonie relativamente grandi, opache che viste in trasparenza non dimostrano alcuna struttura.
- f) Colonie relativamente grosse, con margine approssimativamente rotondo, di struttura grossolanamente cristallina che appare talvolta poco, talvolta assai distinta. In questo ultimo caso assomigliano alle colonie descritte per il *Tbm. helveticum*.

Di questi tipi è caratteristico solamente quello indicato sotto c).

Le colonie di *Tbm. helveticum* invece appartengono al cosiddetto tipo cristallino, tipo che si manifesta qualora la colonia risulta composta da bastoncini riuniti in fasci paralleli; questa disposizione determina la figura esteriore della colonia in modo da comparire come un conglomerato cristallino sviluppato in piano, prestando numerosi piani e spigoli, ed inoltre - nella osservazione in trasparenza - si nota una vivace iridescenza.

Questo tipo si può riscontrare nelle colonie superficiali degli aerobi sporigeni ed assomiglia più o meno al cosiddetto tipo « ruvido » (rough) che si osserva nella dissociazione del gruppo Coli-aerogenes.

L'aspetto normale delle colonie di *Tbm. helveticum* è caratterizzato dal tipo grossolanamente cristallino.

Orla Jensen e collab. (1) affermano che i termobatteri che producono acido lattico inattivo, cioè *Tbm. helveticum*, *Tbm. jugurt* e *Tbm. intestinale*, danno quasi sempre luogo a colonie tipo « caput medusae » (cioè con margini dai quali partono appendici somiglianti a trecce di capelli), queste colonie per lo più non si verificano per i termobatteri che producono acido lattico levogiro (*Tbm. lactis* e *Tbm. bulgaricum*).

Il Puntoni (2) asserisce d'altra parte di aver riscontrato che i ceppi di termobatteri isolati dal *Kos* (latte acido prodotto in Albania, uguale allo jogurt), con colonie granulose e tipo « caput medusae », producevano acido lattico inattivo e lievemente destrogiro, indipendentemente dal tipo delle colonie.

Kantardjief (3) trova per i termobatteri in aerobiosi sulla superficie dell'agar siero-peptone, tre tipi di colonie e precisamente:

- 1) irregolarmente rotondeggianti o debolmente ed irregolarmente lobate, molto sottili e trasparenti, non lucide, con il $d = 1,5 - 2$ mm. Struttura interna fioccoso-cristallina. Margine sinuoso verso l'interno, regolarmente trasparente, nel centro macchiato o granuloso; a $94\times$ il margine ha la forma di una massa di capelli, interno della colonia si presenta come una massa scompigliata.
- 2) a forma di disco, sopraelevate sino ad assumere la forma di goccia di lucentezza umida, semi-trasparente (giovani quasi trasparenti) con il

(1) Orla Jensen S.A., D. Orla Jensen, O. Winter: *Bacterium bifidum und Tbm. intestinale* - « Zentralbl. f. Bakter », Abt. II, 1935-36.

(2) Puntoni: *Dissociazione del bacillo bulgaro* - Annali di microbiologia, Vol. II, fasc. IV, 1942.

(3) Kantardjief A.: loco cit.

d= 0,80 - 0,9 mm. struttura tipicamente cristallina; a 34_x non si osserva più struttura cristallina, ma uniformemente granulosa e verso il centro la colonia risulta più scura. A 94_x il margine ha forma di una massa di capelli, struttura interna nelle vicinanze del margine scompigliata, verso l'interno granulosa.

- 3) come il 2, soltanto il diametro arriva a 1,5 mm. sopraelevate e bianchicce, non spiccatamente cristalline, a 32_x il centro scuro e non trasparente, solo la zona del margine risulta trasparente, a 94_x il margine non si presenta spiccatamente come una massa di capelli, ma più decisamente contornato.

Karnicki e Dorner (1) invece, danno per i termobatteri i seguenti tipi di colonie, che possono svilupparsi sulla superficie dell'agar tanto in aerobiosi quanto in anaerobiosi:

- a1) colonie piatte trasparenti del diametro di 1 mm., con prolungamenti a forma di masse di capelli;
- a2) piatte, trasparenti senza o con piccoli prolungamenti, con il diametro di 1 mm., di struttura più o meno concentrica e margini più trasparenti. In genere assomigliano al tipo a1, ma sono più regolari.
- a3) irregolarmente rotonde, piatte, di lucentezza umida, con il centro sopraelevato e margini più trasparenti;
- b) colonie rotonde sopraelevate, di lucentezza umida e di struttura cristallina o debolmente cristallina;
- c) colonie grosse sopraelevate, di lucentezza umida e senza struttura cristallina.

I nominati A.A. non trovano che le suddette colonie siano caratteristiche per le singole specie dei termobatteri, inquantochè, dai sette ceppi classificati come *Tbm. helveticum*, quattro presentano colonie del tipo b) sull'agar siero-peptone in anaerobiosi, due del tipo a1) e uno del tipo c).

c) *La capacità di acidificare i glucidi ed alcoli polivalenti.*

Una delle principali caratteristiche su cui si basa la classificazione delle specie appartenenti al genere *Thermobacterium* riguarda la capacità di acidificare i glucidi ed alcoli polivalenti.

Alcuni A.A. con Orla Jensen in testa, le danno un'importanza decisiva, mentre altri, pur dandole un notevole valore diagnostico, non la ritengono sufficiente per la determinazione della specie e spesso ne tengono poco conto, se l'assieme degli altri caratteri collima in modo da definire sufficientemente il microrganismo in esame.

Per la determinazione della detta proprietà, si dà molta importanza al procedimento tecnico ed in particolar modo alle sostanze azotate adoperate nei terreni nutritivi base. Orla Jensen dà molto peso anche alla quantità di acidità prodotta.

(1) Karnicki F. e Dorner W.: *loco cit.*

Orla Jensen e collaboratori (1) hanno ripetutamente dimostrato che la capacità di fermentare i glucidi non può essere messa in rilievo con la sola aggiunta di tornasole, in quanto la colorazione rossa di questo, può dipendere dalle impurità di sostanze azotate o glucidi che vengono aggiunti.

Affermano inoltre che bisogna tener conto anche della qualità delle sostanze azotate aggiunte, perchè il potere fermentativo di alcuni batteri dipende in parte dalla forma sotto la quale è aggiunto l'azoto. Per es.: il peptone Witte contiene azoto sotto forma poco adatta per lo sviluppo dei fermenti lattici, mentre si presenta assai adatto il peptone ottenuto dalla digestione della caseina. Queste sostanze, per se stesse e forse anche meglio per gli attivatori che contengono, permettono l'attacco di alcuni zuccheri difficilmente fermentescibili.

Ciò è stato confermato anche da Eagles e Sadler (2).

Orla Jensen e collab. riportano una tabella, nella quale mettono in evidenza la costante capacità delle singole specie appartenenti al genere *Thermobacterium* di fermentare alcuni glucidi con la produzione di notevoli quantità di acido lattico, durante un periodo di 17-20 anni. (Per il *Tbm. helveticum* vedi tabella n. 1).

Commentando la tabella, gli A.A. scrivono quanto segue: « La tabella « dimostra che il *Tbm. helveticum* ed il *Tbm. jugurt* non sono stati capaci, « nel corso degli anni, di fermentare saccarosio, raffinoso, inulina e salicina. Anche la loro capacità di fermentare il levulosio, si è dimostrata assai « debole, particolarmente per il *Tbm. jugurt*. Nei riguardi del potere fermentativo, i due batteri si distinguono solamente perchè il *Tbm. Jugurt* « non fermenta in nessuna circostanza maltosio, destrina ed amido, mentre « ciò è possibile, con aggiunta di particolari composti azotati (peptone ottenuto dalla caseina ed estratto di lievito), al *Tbm. helveticum*, *Tbm. jugurt* e *Tbm. bulgaricum*; hanno un habitat così specifico nel latte che, dei « disaccaridi, fermentano solamente il lattosio. Dalla tabella risulta inoltre « che il *Tbm. bulgaricum* stenta a fermentare il galattosio, pur essendo « questo un prodotto della scissione del lattosio. Come è stato detto, il *Tbm. bulgaricum* produce acido lattico levogiro e normalmente non si riscontra « nelle feci ».

Dalla tabella risulta anche che tutti i ceppi di *Tbm. lactis* fermentano costantemente levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio e salicina.

A. Kantardjief (3) ha studiato sette ceppi di termobatteri isolati dallo jogurt, due ceppi delle culture per formaggio di Liebefeld e Rütli e quattro ceppi dal « caglio naturale ».

Il terreno base conteneva acqua di lievito, preparata con circa 7,5% di lievito compresso (dalla quale è stato allontanato lo zucchero facendovi sviluppare il *Bac. coli*), 0,1 % di peptone (non meglio specificato), 1,5 % dello zucchero in esame e 1 cc. di soluzione di tornasole.

(1) S. Orla Jensen e collab.: *loco cit.*

(2) Eagle A. e Sadler W.: « *Canad. Journ. Research.* », Vol. 7, 1932, pag. 364.

(3) Kantardjief A.: *loco cit.*

Dall'esame di sette ceppi di termobatteri isolati dallo jogurt originale, l'A. ha trovato che cinque fermentano colla stessa intensità (+) il maltosio di altri due isolati dalle culture casearie di Liebefeld e Rütli e di un ceppo isolato dal caglio naturale. Secondo questo risultato la caratteristica sostanziale, cioè la capacità di fermentare il maltosio, che differenzia il *Tbm. helveticum* dal *Tbm. bulgaricum* (secondo Orla Jensen) cadrebbe, a meno che si vogliano considerare i ceppi isolati dallo jogurt come *Tbm. helveticum*. D'altra parte questa constatazione ha un valore relativo, non avendo Kantardjief misurato la quantità di acidi prodotti a spese dei singoli glucidi ed alcoli.

L'A. ha inoltre constatato come un ceppo isolato dallo jogurt che non fermentava il maltosio, ha dato, dopo alcuni trapianti, luogo a due tipi diversi di colonie comprendenti ambedue bastoncini capaci di fermentare il maltosio e, oltre a questo, xilosio e mannosio che prima non venivano fermentati.

Burri e Kollmann riportano dati molto importanti riguardanti la capacità di acificare i glucidi ed alcoli. Il terreno nutritivo per la ricerca del potere fermentativo era composto nel seguente modo: peptone Witte gr. 10 - peptone Merk per batteriologia gr. 10 - estratto di carne Oxo Bouillon gr. 5 - lievito autolisato gr. 5 - p.H. = 6.0. Come indicatori furono usati bromocresolverde e bromocresolporpora in soluzione 1% aggiunti in ragione di 17.5 cc. per ogni litro di terreno.

Bisogna premettere che gli A.A. davano la massima importanza per la determinazione delle singole specie ai seguenti caratteri forma superficiale delle colonie sull'agar a becco di clarino con chiusura anaerobica, massima temperatura di sviluppo, massima produzione di acidità.

Gli A.A. hanno studiato 128 ceppi di *Tbm. helveticum* classificati in base alle suddette caratteristiche, isolati dal formaggio emmental fresco, dal caglio e dalle culture adoperate per la fabbricazione del formaggio. Dagli stessi substrati furono isolati 119 ceppi appartenenti al *Tbm. lactis*.

Burri e Kollmann hanno constatato che i 120 ceppi appartenenti al *Tbm. helveticum* acidificano costantemente destrosio, mannosio, galattosio e lattosio, in maggioranza, anche levulosio, maltosio, destrina.

Ripetendo le prove del potere fermentativo ad intervalli di parecchi mesi, alcuni ceppi perdevano od acquistavano la capacità di fermentare levulosio, maltosio e destrina. Tra questi ultimi il maltosio era quasi sempre fermentato. Perciò gli A.A. dividono la capacità fermentativa del *Tbm. helveticum* in una parte costante e precisamente: glucosio, galattosio, mannosio e lattosio, ed una incostante: levulosio, maltosio, destrina.

La capacità di fermentare il maltosio non sarebbe dunque un carattere fisso del *Tbm. helveticum* come afferma Orla Jensen. E' stato riscontrato un ceppo il quale non fermentava mai il maltosio.

Un gruppo di ceppi ha fermentato anche il raffinosisio.

Per i 119 ceppi di *Tbm. lactis* gli A.A. hanno riscontrato che solo 29 fermentavano tutti gli zuccheri indicati da Orla Jensen: levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, destrina e salicina, men-

tre gli altri non fermentavano alcuni dei seguenti zuccheri: levulosio (18 ceppi), saccarosio (11 ceppi), maltosio (25 ceppi); destrina (14 ceppi), salicina (64 ceppi).

Ripetendo l'esame della capacità fermentativa dopo 6-12-18 mesi, alcuni ceppi acquistavano o perdevano la capacità di acidificare levulosio, saccarosio, maltosio, destrina e salicina in modo che, anche il potere fermentativo del *Tbm. lactis*, sarebbe rappresentato da una parte costante: destrosio, mannosio, galattosio e lattosio, ed una non costante: levulosio, saccarosio, maltosio, destrina, salicina. Così anche per il *Tbm. lactis* l'affermazione di Orla Jensen circa la costante capacità di questo ceppo di fermentare il maltosio e saccarosio, sarebbe in contrasto con i suddetti risultati ottenuti da Burri e Kollmann; questa affermazione, naturalmente non può essere categorica, dato che Orla Jensen dà valore alla capacità fermentativa solo quando l'acidità prodotta viene messa in evidenza anche quantitativamente.

Risulta dunque che tanto i ceppi appartenenti al *Tbm. helveticum*, quanto al *Tbm. lactis* fermentano costantemente i medesimi zuccheri e precisamente: destrosio, mannosio, galattosio e lattosio.

Gli A.A. hanno inoltre trovato numerosi ceppi da considerarsi appartenenti al *Tbm. lactis* con seguenti « simboli » di fermentazione:

- 1) sorbite, mannite, levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, destrina, salicina (5 ceppi);
- 2) sorbite, mannite, levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, raffinofosio, destrina, salicina (15 ceppi);
- 3) levulosio, destrina, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffinofosio, destrina, salicina (1 ceppo).

Secondo Burri e Kollmann i ceppi del *Tbm. lactis* da loro studiati si dividono, in base alla capacità di fermentare i glucidi, in totale in quattro gruppi, comprendenti ciascuno rispettivamente 29 - 59 - 15 - 1 ceppi.

Tra gli altri lavori riguardanti la capacità di fermentare alcuni glucidi, sono importanti le ricerche di Winegge e Henneberg (1) i quali affermano che il *Tbm. lactis* conserva la proprietà di fermentare il maltosio anche se per degli anni viene coltivato nel latte (privo di maltosio).

Nei riguardi del *Tbm. bulgaricum* invece hanno constatato quanto segue: degli 11 ceppi appena isolati dallo yogurt originale, 8 non erano capaci di fermentare il maltosio, due debolmente ed uno fortemente; dopo 4 trapianti in latte aggiunto di maltosio, 9 ceppi acquistavano la capacità di fermentare fortemente il maltosio ed uno debolmente (in totale tutti i ceppi fermentavano il maltosio). Dopo tre settimane di trapianti in latte senza maltosio, 9 ceppi non fermentavano più il maltosio, tre invece ancora un po' (pag. 111). In un'altra pagina gli A.A. affermano che « Uebrigens sind *Th. bulgaricum* und *Th. lactis* keineswegs als Arten im botanischen Sinne aufzufassen; ersteres kann wohl nur als eine durch bestaenclige Zuechtung in Milch bei 45°-50° « abgeschwaechte » (s. Zuckerreihe) Rasse des *Th.*

(1) Winegge e Henneberg W.: *Zur Kenntnis der stäbchenförmigen Milchsäurebakterienarten* - « Zentralbl. f. Bakter. », II Abt., Vol. 91, 1934-1935, pag. 102.

TABELLA N. 1

Specie	Ceppo N.	Autore	Glicerina	Xilosio	Arabinosio	Ramnosio	Sorbito	Mannite	Levulosio	Destrosio	Mannosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Raffinosio	Insulina	Destrina	Amido	Salicina
Tbm. lactis	6	Orla Jensen	0	0.5	0.5	0.2	0	6.8	11.3	9.7	13.7	1.1	11.9	12.4	7.9	11.5	5.4	6.1	5.6	10.1
"	7	"	0	0	0.5	0.2	0	—	14.9	14.6	14.2	5.6	13.3	13.5	9	0.7	0	7.9	6.1	5.5
"	8	"	0.2	1.1	1.1	0.5	0.2	0	16.2	15.1	14.9	7.9	14.9	11.9	9	3.2	0.7	5.2	4.3	11.5
"	9	"	0	0	1.1	0.2	0.2	0	16.0	14.9	14.9	13.5	17.1	14.2	15.5	5.2	0.2	6.8	6.5	5.0
"	10	"	0	0	0.7	0.2	0	0	15.1	15.3	14.6	12.4	16.7	13.1	11.3	7.2	5.6	5.4	8.3	1.6
"	11	"	0	0	0.7	0	0	0.7	11.9	13.7	5.2	7.9	14.4	14.4	10.4	0.9	0.2	1.1	0.2	3.4
"	11 ceppi	Karnicki e	0	0	0	0	0	0	0.2	0.9	1.1	0	0.4	0	1.6	0	0	0.2	0	—
"		Dorner (1)	0.5	0.7	0.7	0.4	0.4	0.7	3.8	5.2	6.7	2.5	3.4	7.6	4.7	3.1	0.4	0.9	0.7	2.2

(1) Le cifre riguardano 11 ceppi e sono rispettivamente i minimi e i massimi dell'acidità prodotta tra tutti gli undici.

lactis d.h. als eine « Zuckerreihe-Variation » gelten ». Nei riguardi delle serie dei glucidi ed alcoli, si differenzia poco anche il *Tbm. helveticum* dal *Tbm. lactis*, perchè differenze della fattispecie si riscontrano tra gli stessi ceppi del *Tbm. lactis*. Noi dobbiamo considerare il *Tbm. helveticum* una razza che si sviluppa nello stomaco dei vitelli lattanti, che ha perso la capacità di produrre granuli di volutina.

Il *Tbm. bulgaricum*, nei riguardi della serie dei glucidi ed alcoli, non si distingue dal *Tbm. jugurt*, il quale è da considerarsi una varietà del primo, incapace di produrre granuli di volutina.

F. Karnicki e W. Dorner hanno adoperato il seguente terreno nutritivo per la ricerca dell'acidificazione dei glucidi e degli alcoli:

Brodo di carne di cavallo + 1 % di peptone Witte + 1 % di peptone Merk (dalla caseina) + 0,1 % di estratto di lievito Difco.

Il pH. 6,8; la sostanza in esame veniva aggiunta al terreno in ragione dell'uno per cento prima della sterilizzazione.

I risultati riguardanti il *Tbm. lactis* sono riportati nella tabella n. I.

Gli A.A. hanno classificato come *Tbm. helveticum* sette ceppi, dei quali solo uno dimostra una notevole capacità di fermentare il maltosio, dando una acidità di 3,4 ‰ espressa in acido lattico, mentre gli altri producono solamente 0,4 - 0,7 - 1,1 - 1,3 ‰ di acido lattico.

Tenendo presente che l'Orla Jensen, parlando del *Tbm. intestinale*, afferma che questo bastoncino non produce dai pentosi ed alcoli una fermentazione degna di nota (nennenswerte Vergärung), pur arrivando l'acidità prodotta al 2 ‰ e considera il maltosio non fermentato da parte del *Tbm. bulgaricum e jugurt*, pur essendo l'acidità da questi prodotta di 0,9 ‰ (1), i suddetti ceppi dovrebbero considerarsi incapaci di fermentare il maltosio. Non bisogna d'altra parte dimenticare che l'acidità prodotta a spese dei glucidi ben fermentati e misurata da Karnicki e Dorner, risulta notevolmente più bassa eli quella riscontrata da Orla Jensen.

Gli A.A. inoltre dichiarano che alcun ceppi hanno perduto od acquistato, dopo un periodo di tre mesi, la capacità di acidificare il levulosio.

K. I. Demeter e A. Schmid (2) hanno trovato nel formaggio emmental solamente due gruppi di termobatteri: uno appartenente al *Tbm. helveticum* e l'altro al *Tbm. lactis*. La classificazione ne è stata fatta basandosi sostanzialmente sulla capacità di fermentare il saccarosio ed il maltosio: cioè tutti i ceppi appartenenti al *Tbm. lactis* fermentavano il saccarosio ed il maltosio (oltre ad alcun altri zuccheri), mentre quelli appartenenti al *Tbm. helveticum* fermentavano il maltosio, ma non il saccarosio. Il terreno base addizionato dell'1 % di zucchero è stato quello stesso adoperato da Kantardjjeff, solamente, invece del tornasole, è stato adoperato come indicatore il bleu di bromotimolo. Non è stato riscontrato alcun ceppo che non fermentasse i suddetti zuccheri in modo da presentare dei dubbi nei riguardi della classificazione.

(1) *Loco cit.*, pag. 77 (tabella).

(2) Demeter K. I. e Schmid A.: Über das Verhalten der einzelnen Milchsäurebakteriengruppen bei Emmentaler Käsen.- « Milchw. Forsch. », 1936, Vol. 17, pag. 270.

Secondo Bergey (1) il *Lactobacillus helveticus* (rispondente al *Tbm. helveticum* Orla Jensen) acidifica i seguenti zuccheri: levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio e destrina, mentre dal *Lactobacillus lactis* (rispondente al *Tbm. lactis* Orla Jensen), sono fermentati: levulosio, destrosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffiniosio e destrina.

d) *Qualità dell'acido lattico prodotto.*

Secondo Orla Jensen (2), la qualità ottica dell'acido lattico prodotto dai fermenti lattici è un fattore decisivo per la loro classificazione: il *Tbm. lactis* ed il *Tbm. bulgaricum* producono acido lattico levogiro, mentre il *Tbm. helveticum* e *Tbm. jugurt* inattivo, e il *Tbm. intestinale* acido lattico inattivo puro o con un'aggiunta di levogiro.

Questo valore però è alquanto contrastato da taluni A.A.

Secondo Henneberg (3) il *Tbm. lactis* coltivato in estratto di lievito produce dal destrosio, saccarosio, destrina e maltosio, acido lattico levogiro, mentre dal lattosio destrogiro. Kantardjjeff e Popov (4) hanno constatato che un ceppo di *Tbm. bulgaricum* coltivato in latte e mosto di birra, produceva acido lattico levogiro, mentre nel brodo destrosato inattivo, altro ceppo appartenente alla stessa specie, produceva acido lattico levogiro nel latte e nel brodo destrosato, e inattivo nel mosto di birra.

Interessanti sono a questo proposito i risultati ottenuti da H. Katagiri e W. Kitahara (5) i quali hanno dimostrato che alcune specie microbiche hanno la proprietà di racemizzare acido lattico otticamente attivo.

Tale proprietà è dovuta alla racemasi che essi hanno trovato in diversi fermenti lattici, nonchè in *Staph. ureae*. Il *Lactobacillus sake* sembra influenzato dal mezzo culturale nella elaborazione della racemasi; infatti può dare acido lattico destrogiro, se coltivato in estratto di riso, e racemico, se coltivato in estratto di lievito.

e) *Temperature di sviluppo e coagulazione del latte.*

I termobatteri richiedono, come dice il loro nome, temperature relativamente alte per il loro sviluppo.

Secondo Orla Jensen (6) la temperatura ottima è a circa 40° C., la massima di regola è a 50° C., ma il *Tbm. bulgaricum* cresce ancora a 52,5° C. Non crescono sotto i 20-22° C. ed anche a 30° C. lo sviluppo è molto lento; ne fa eccezione un ceppo che cresce ancora a 18° C. Generalmente non vengono uccisi alle temperature inferiori a 75° C.

Burri e Kollmann (7), che danno grande importanza alle temperature

(1) Bergey D. H.: *Determinative Bacteriology* - 5 Ed., London, 1939.

(2) Orla Jensen: *loco cit.*

(3) Henneberg W.: *Handbuch der Gärungsbakteriologie* - II Abt., pag. 130, 1926.

(4) Kantardjjeff A. e Popov I.: *Über die optische Modification der vom sog. Bact. bulgaricum gebildete Milchsäure* - «Milchw. Forsch.», 1931, Vol. II.

(5) Katagiri H. e Kitahara W.: «Biochem. J.», 31, 1937, pag. 909; e «Jahr. chem. Soc. Japan», II, 1939; pag. 997.

(6) Orla Jensen: *loco cit.*

(7) Burri e Kollmann: *loco cit.*

TABELLA N. 2

KARNICKI E DORNER (1) Tbm. helv., bulg. e lactis		KANTARDIEFF (2) Tbm. bulg., lactis e helveticum		VIRTANEN E LUNDMARK (3) Bact. casei epsilon	
% di N. solub. nel latte (*)		% di N. solub. nel latte (**)		Tempo trascorso in ore dopo l'ag- giunta di toluolo	
Controllo	Culture in latte magro con creta dopo 6 settimane a 30° C.	Controllo	Le culture in latte con creta sono state tenute per 5 giorni in termostato poi a 25° C.	N. sol. in % del N. totale (***)	Azoto ammidico in % N. totale
0,089	0,13 — 0,20	0,0375	0,075 — 0,141	44-24 — 96-71	2-4# 8 23.25

(*) Le sostanze proteiche sono state precipitate coll'acetato di uranile, perciò il N ammoniacale passa nel filtrato (Vedi F. Kopatschek: *Nachweis des Ammoniaë in der Milch.* - « Milch. Zentralbl. », 1931, pag. 309).

(**) Le sost. proteiche sono state precipitate coll'acido fosfowolframico e il N. solubile determinato nel filtrato.

(***) Culture in latte magro con creta sono state tenute a 37° C. per 24 ore, poi aggiunte di toluolo e tenute ancora sempre a 37° C. Dopo l'aggiunta di toluolo le culture risultarono morte. Le proteine sono state precipitate a 100° C. coll'acido acetico e il N. solub. determinato nel filtrato. N. ammidico è stato determinato con il metodo Van Slyke.

(2) *Loco cit.*

(1) *Loco cit.*

(3) Virtanen A. E. e Lundmark E.: *Über des Wesen der Käseinspaltung durch Milchsäurebakterien.* - « Milchw. Forschungen », 1929, Vol. 8, pag. 375.

TABELLA N. 3

BARTHEL (1) <i>Bact. casei epsilon</i>		ORLA JENSEN (2) <i>Bact. casei epsilon</i>		
Tempo di incubazione	In % di N. totale		Tempo di incubazione	In % di N. totale
2 mesi	N. solubile	N. degli amminoacidi (Van Slyke)	Un paio di mesi	N. solubile
	33.66	23.08		N. degli amminoacidi ammoniacale
		5.09		N. ammoniacale
				36.12
				34.60
				3.91
Culture in latte aggiunto di creta tenuto a 36° C. per due mesi. Latte aggiunto di creta				

(1) Barthel Chr.: *Das kaisenspaltende Vermögen von zu Gruppe Streptococcus lactis gehörenden Milchsäurebakterien.* - « Zentrabl. f. Bakter. », II Abt., Vol. 44, 1916, pag. 76.

(2) Orla Jensen: *Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft.* - Jena, 1913.

di sviluppo anche nei riguardi della classificazione, affermano che solo il *Tbm. lactis* è in grado di svilupparsi a 51° C., mentre la crescita degli al-tri termobatteri non si verifica più a tali temperature.

Karnicki e Dorner (1) trovano che gli ottimi di sviluppo oscillano tra 37° e 45° C. e mettono in rilievo che il rapido sviluppo nel latte non permette di precisare con esattezza la temperatura ottima di sviluppo, inquantochè il latte coagula nello stesso tempo tanto a 37° quanto a 42° e 45° C.

Sempre secondo i suddetti AA. il latte tenuto a temperature ottime di sviluppo ed innestato con 0,5 % di cultura impiega a coagulare, a secondo del ceppo in esame, da 12 a 48 ore.

In genere i più rapidi sono i ceppi appartenenti al *Tbm. lactis*. Le temperature ottime alle quali si arriva al massimo grado di acidità, sono generalmente inferiori a quelle di sviluppo e quasi sempre si trovano a 30° e 37° C. Tra le temperature ottime di sviluppo e queste non esiste alcun rapporto.

Secondo Henneberg (2) le culture appena isolate del *Tbm. lactis* hanno in principio un ottimo sviluppo a 40-48° C., più tardi a 36-40° C.; l'ottimo di acidificazione è, all'inizio, a 41-42° C., mentre più tardi scende a 36-37° C.

Per il *Tbm. helveticum* cioè *Lactobacillus helveticus* il Bergey (3) indica le seguenti temperature: minima 20-22°, ottima 40-42° C. e massima 50° C.

Come è già stato detto altrove, secondo Burri e Kollmann, una delle principali caratteristiche del *Tbm. helveticum* è il mancato sviluppo alle temperature superiori a 50° C., Pjeturson (4) ha trovato infine per un ceppo che temperature ottime si trovano già a 30-40° C.

f) *Il potere proteolitico.*

E' noto che i termobatteri si riscontrano nei formaggi a pasta cotta, particolarmente nei primi giorni di maturazione, in quantità tali da prendere un'assoluta predominanza su tutti gli altri microbi. Perciò la loro capacità di attaccare le sostanze proteiche, ed in particolar modo la caseina, assume un'importanza fondamentale per l'andamento della maturazione dei formaggi sopraindicati.

La teoria di V. Freudenreich, secondo la quale i bastoncini lattici sono da considerarsi principali maturatori dei formaggi svizzeri a pasta cotta, si basa sostanzialmente sulla capacità di questi di trasformare la caseina in composti azotati solubili.

Tale proprietà è stata dimostrata da numerosi autorevoli autori colle culture in latte magro aggiunto di carbonato di calcio. In detto terreno il pH. risulta pressochè uguale a quello della pasta dei formaggi cotti.

(1) Karnicki e Dorner: *loco cit.*

(2) Henneberg W.: *loco cit.*

(3) Bergey: *loco cit.*, pag. 17.

(4) Pjeturson: cit. Demeter in Löhns: « Handb. d. Landw. Bakteriologie », 1941.

Nella tabella n. 2 sono riportati i dati ottenuti da Orla Jensen (1), Karnicki e Dorner (2), Barthel (3), Virtanen e Lundmark (4). Dalla stessa risulta come le principali specie del genere *Thermobacterium* sono capaci di solubilizzare circa il 30-40% di azoto contenuto nel latte magro.

Unico Autore che asserisce di non aver riscontrato detto potere, nei bastoncini lattici è Weigner (5) ma, al suo lavoro, si possono muovere serie obiezioni dal punto di vista microbiologico nei riguardi della qualità dei ceppi adoperati ed anche della stessa purezza delle culture.

TABELLA N. 4

Specie microbica (*)	N. solubile totale in %	N. solubile meno N. degli albuminosi e peptoni superiori in % (**)
Tbm. lactis	39,8	35,6
Tbm. lactis	24,0	22,2
Tbm. helveticum	39,7	29,0
Tbm. bulgaricum	26,9	23,4

(*) le culture furono allestite in latte sterile aggiunto di 2% di carbonato di calcio. Dopo l'innesto furono tenute per 15 ore a temperatura ottima di sviluppo ed il resto del tempo a temperatura di ambiente.

(**) Precipitati con acido tannico.

3. - Tecnica della sperimentazione

a) CARATTERI GENERALI DEI CAMPIONI DI SIERO-FERMENTO, DAI QUALI FURONO ISOLATI I CEPPI STUDIATI.

Prima di passare in rassegna i metodi usati nella tecnica della sperimentazione, si ritiene utile riportare alcuni caratteri dei campioni di siero-fermento, dai quali furono isolati ceppi studiati. Questi campioni sono stati prelevati sempre presso i caseifici, nei quali il grana prodotto veniva classificato quasi nella totalità dei casi come « scelto ». Infatti tutte le forme fabbricate con il siero-fermento esaminato, controllate dopo un anno e mezzo o due anni circa di stagionatura, non presentano difetti di sorta.

(1) Orla Jensen: *loco cit.*

(2) Karnicki e Dorner: *loco cit.*

(3) Barthel, *loco cit.*

(4) Virtanen e Lundmarck *loco cit.*

(5) Weigner: *cit. Kantardjieff, loco cit.*

(6) Drewes K.: *Die Reifungspitze des Säuremilchkäses unter besonderer Berücksichtigung ihres Kaseinabbauvermögens* - « *Milchw. Forsch.* », Vol. 18, 1937, pag. 289.

Ceppo N.	Materiale di provenienza
1-11	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 9-1-1940. Al microscopio si osservano moltissimi bastoncini e solo pochi cocchi. Sull'agar Kuntze sono stati contati circa 210 milioni di bastoncini e 16 milioni di cocchi. Acidità 50,6° S.H.
12-18	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 18-1-1940. Al microscopio si osservano moltissimi bastoncini ed assai pochi cocchi. Nell'agar Kuntze sono stati contati 180 milioni di bastoncini e 40 milioni di cocchi. Acidità 48° S.H.
19-24	Siero-fermento del caseificio C.M. prelevato il 12-2-1940. Al microscopio risulta composto quasi totalmente dai bastoncini. Nell'agar Kuntze sono stati contati circa 2400 milioni di bastoncini. Nella diluizione 1 : 10 milioni non sono state riscontrate colonie di cocchi. Acidità 51,6° S.H.
30-35	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 15-2-1942. Al microscopio quasi soli bastoncini. Nell'agar-siero-peptone (Dorner) circa 1800 milioni di bastoncini. Acidità 49,6° S.H.
40-42	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 13-8-1942. Al microscopio risulta composto quasi solamente da bastoncini dritti o leggermente ricurvi, isolati o riuniti a due a due per lo più ricchi di granuli. Si notano pochi cocchi. Acidità 42° S.H. Nell'agar siero-peptone sono stati contati circa 1400 milioni di bastoncini, mentre nella diluizione 1 : 10.000.000 non sono stati riscontrati cocchi.
36-37	Siero-fermento del caseificio I.C.L. prelevato il 10-8-1941. Acidità so,so S.H.
45-52	Siero-fermento prelevato nel caseificio C.R. il 13-11-1942; al microscopio sono stati osservati bastoncini e cocchi in rapporto di circa 5 : 1. Bastoncini dritti di diametro uniforme (0,8 - 0,9) lunghi per lo più 5-6, ma anche da 2-9 micron. Alcuni presentano granuli. Tanto nelle provette a chiusura Burri come nelle piastre coll'agar-siero-peptone (Dorner) sono stati contati più di 2.000 milioni di microbi, in gran parte rappresentati da bastoncini, i quali - dopo 72 ore a 41° C. - davano colonie di 1 mm. ramificate come le radici un po' corte di un albero (10 x). Acidità 31° S.H.
53-36	Siero-fermento prelevato nel caseificio O. il 17-11-1942. Al microscopio sono stati osservati bastoncini e cocchi in rapporto 10 : 1. Bastoncini di 0,6-0,9 micron x 1,5-7 micron (la maggioranza 3-4 micron) quasi sempre isolati, raramente due a due. Sono stati contati circa 1600 milioni di microbi per cc. rappresentati da bastoncini lattici ad eccezione di circa 180 milioni rappresentati dai gassogeno-coagulanti di Dalla Torre. Acidità 46,2° S.H.
62-63	Siero-fermento prelevato nel caseificio C. il 14-11-1942. Sono stati contati circa 1.200 milioni di bastoncini. Al microscopio sono stati osservati solo bastoncini assai uniformi, delle dimensioni di 0,7-0,8 x 2-6 micron, dritti, isolati o due a due. Acidità 54,6° S.H.

**C O N S O R Z I O
P R O D U T T O R I
L A T T E DI M I L A N O**

primo esempio di un organismo volontario sorto in Italia per incrementare la produzione lattiera e per attuare norme e direttive tecniche igieniche nei rapporti del problema del "buon latte", da destinarsi ai rifornimenti dei maggiori centri urbani.

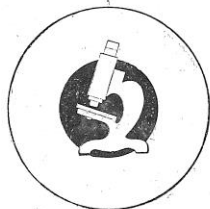
*Soltanto un macchinario moderno
consente una lavorazione razionale*

BRAP

- Impianti completi per tutte le lavorazioni del latte.
- Elettropompe Triumphator
- Scrematrici Triumphator
- Tele ritorte Morgenthaler
- Tele industriali

BRAP - Corso Milano 12a - Tel. 4019 - MONZA

CENTRO SPERIMENTALE DEL LATTE



- Fermenti selezionati per tutti i formaggi tipici
- Culture acidificanti ed aromatizzanti per burro
- Tutte le analisi microbiologiche e chimiche del latte e dei latticini
- Muffe selezionate per gorgonzola
- Consulenze tecniche scientifiche per l'industria lattiero casearia

MILANO - PARCO RAVIZZA - VIA SALASCO, 4 - TEL. 51.208 - 50.715

b) PREPARAZIONE DEI TERRENI NUTRITIVI

Per l'isolamento dei termobatteri furono adoperati con ottimi risultati agar-siero-peptone e agar di Kuntze. Quest'ultimo fu, in seguito, abbandonato perchè filtra assai difficilmente e rimane sempre un po' torbido. All'inizio della sperimentazione si è provato a preparare l'agar-siero-peptone in due modi: aggiungendo peptone ed agar direttamente al siero di grana disalbuminizzato e seguendo le indicazioni di Demont e Dorner (1). Nel primo caso le colonie non si sviluppano sempre bene, mentre coll'agar-siero peptone, preparato con sistema Demont e Dorner, si ottennero sempre e costantemente buoni risultati. Quest'ultimo si prepara nel seguente modo: si preleva dalla caldaia, appena estratto il formaggio, il siero residuo della fabbricazione del grana e si addiziona 1,5 % di sale di cucina; si tiene in autoclave per un'ora a 105° C. e, dopo aver lasciato riposare per 24 ore, si filtra. A parte si sciolgono in autoclave a 120° C. gr. 24 di agar in 1100 cc. di acqua potabile; si aggiungono al liquido caldo gr. 12 di peptone Witte, gr. 2 di fosfato bisodico e cc. 400 di siero trattato nella maniera sopra indicata. (E' bene sciogliere il peptone nel siero prima di aggiungerlo alla soluzione contenente l'agar). Si porta il pH a 6,8 e si aggiungono dei chiari d'uovo sbattuti con un po' d'acqua; si riscalda nuovamente il liquido in autoclave a 108° C. circa per un quarto d'ora, dopo di che si filtra e si sterilizza a 100° C. per 20'. Se la preparazione viene eseguita bene, tanto il siero quanto l'agar contenente le chiare d'uova filtrano assai rapidamente e risultano perfettamente limpidi. Una parte dell'agar veniva solidificata nelle provette a forma di becco di clarino in modo che la parte superiore del terreno rimaneva distante circa 5 cm. dall'orlo della provetta.

L'agar di Kunze si prepara nel seguente modo: si sciolgono cc. 100 di acqua, gr. 8 di lattosio e gr. 3 di agar e, dopo, si aggiungono cc. 200 di latte magro e gr. 3 di peptone. Si scalda a 100° C., si filtra, si riscalda nuovamente e si filtra un'altra volta. Senza neutralizzare, si sterilizza a 100° C. per 15' per tre giorni.

Anche nella ricerca della capacità fermentativa degli zuccheri sono stati provati due tipi di terreni base: uno indicato da Kantardjjeff (2) (usato anche da Demeter e Schmid) e l'altro da Burri (3) parzialmente modificato.

In un primo tempo è stato adoperato il terreno proposto da Kantardjjeff (acqua di lievito al 10 % privata di zuccheri con un ceppo di *Bact. coli* e aggiunta di 0,1 % di peptone), in seguito invece fu adottato solo quello di Burri (in parte modificato), perchè nel primo alcuni ceppi si sviluppavano assai stentatamente.

(1) Demont e Dorner: *loco cit.*

(2) Kantardjjeff: *loco cit.*

(3) Burri: *loco cit.*

Burri indica la seguente formula:

- acqua	cc.	1000
- Peptone Witte	gr.	10
- Peptone Merck	»	10
- Estratto di carne (Oxo Bouillon)	»	5
- Lievito autolisato (Difco)	»	5

pH = 6,0

Detto terreno fu parzialmente modificato come segue: l'acqua e lievito autolisato furono sostituiti coll'acqua di lievito al 15 % (in un litro d'acqua si fecero bollire gr. 150 di lievito compresso e si lasciarono riposare per due giorni; per decantazione si separava il liquido dal deposito e si portava ad un litro), il peptone Merck con il peptone Acas e Oxo Bouillon con l'estratto di carne Liebig. Il liquido così preparato fu seminato con un ceppo di Bac. coli (per eliminare lo zucchero presente), dopo 24 ore di termostato corretto a pH 6,8 e aggiunto di un chiaro d'uovo sbattuto con un po' d'acqua, scaldato in autoclave e filtrato.

Per la propagazione e conservazione delle culture fu usato il latte magro, sterilizzato in autoclave a 115° C. per 15'.

c) ISOLAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CEPPI

I ceppi, in numero di 42, furono isolati da nove campioni di siero-fermento provenienti da due caseifici del lodigiano e uno del modenese, nei quali veniva fabbricato il formaggio grana uso reggiano. Il siero-fermento fu prelevato in primavera ed in estate, durante i periodi nei quali la lavorazione procedeva normale. I campioni presentavano un'acidità che oscillava tra i 48 e 51° S.H., tranne uno che aveva solo 42° S.H. Da quest'ultimo sono stati isolati i ceppi n. 40-41 e 42. I campioni di siero-fermento contenevano da circa seicento milioni a circa due miliardi di microbi per cc., rappresentati quasi esclusivamente dai termobatteri; gli altri microbi, quasi costantemente presenti, appartenevano allo *Str. thermophilus* ed ai lieviti. Un paio di volte sono stati isolati i gassogeno-coagulanti di Della-Torre.

Per l'isolamento sono state fatte diluizioni in acqua sterile che venivano seminate in agar-siero-peptone preparato secondo Demont e Dorner (vedi pag. 21) e nell'agar di Kuntze. Dopo tre giorni di termostato, a 31° C., le colonie ben sviluppate ed isolate furono trapiantate nel latte magro.

Dalle provette nelle quali il latte venne coagulato si procedette, per la purificazione, alla semina dell'agar-siero-peptone inclinato a becco di clarino, incubando in anaerobiosi secondo il metodo Wright-Burri modificato da Ritter e Dorner. Dopo tre giorni di termostato a 37° C. si fece nuovamente il trapianto delle singole colonie.

Le culture pure, ottenute nel suddetto modo, furono trapiantate ogni dieci giorni nel latte magro e conservate a circa 4° C. La propagazione venne fatta a 40° C. e le culture si toglievano dal termostato appena avvenuta la coagulazione del latte.

d) FORMA DELLE CELLULE MICROBICHE

Per l'esame microscopico sono state adoperate le culture in latte magro appena coagulato e le colonie di 48 o 72 ore, sviluppatasi sull'agar-siero-peptone inclinato a becco di clarino, nelle provette con chiusura anaerobica di Wrigh-Burri modificata da Ritter e Dorner, oppure sullo stesso terreno in scatole Petri (1).

Oltre all'esame a fresco, furono allestiti preparati colorati con il metodo di Gram, con bleu di Löffler (in particolar modo per la ricerca dei granuli di volutina) seguito dalla immersione nella soluzione di acido acetico al ½ %, e con bleu di china. Come è già stato dimostrato altrove dallo scrivente (2), il metodo di bleu di china si presta assai bene per la colorazione di microbi provenienti dalle colonie, inquantochè il fondo del preparato rimane uniformemente colorato in bleu, mentre le cellule microbiche rimangono incolori.

e) FORMA DELLE COLONIE

L'esame delle forme delle colonie fu eseguito sulle culture allestite col l'agar-siero-peptone, in scatole Petri od a becco di clarino con chiusura anaerobica di Wright-Burri modificata da Ritter e Dorner.

Detta chiusura dà dei risultati realmente soddisfacenti nelle culture di microbi che si sviluppano di preferenza in anaerobiosi; si ottiene spingendo nella provetta, per qualche centimetro dal bordo, il tappo di cotone previamente tagliato all'altezza del bordo, poi si introduce un batuffolo di cotone idrofilo, versandovi sopra un cmc. della soluzione di pirogallolo al 20 % e un cmc. della soluzione di carbonato sodico al 25 % (anidro); si chiude immediatamente con un tappo di gomma umido. Le colonie dei termobatteri così ottenute, presentano, per singoli ceppi, alcuni caratteri differenziali facilmente individuabili ad occhio nudo o con una lente a 10 ingrandimenti.

f) TEMPO DELLA COAGULAZIONE DEL LATTE

Il latte magro sterile, contenuto nelle provette in ragione di 10 cc. cadauna, si innestava con 0,1 cc. di cultura appena coagulata. Si teneva in termostato a 40° C., controllando ogni ora la consistenza del liquido, senza scuotere le provette.

g) DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ACIDITA' NEL LATTE E NEL SIERO-PEPTONE

Nelle boccette della capacità di circa 100 cc. contenenti 50 cc. di latte magro o siero-peptone, si innestava cc. 0,1 di cultura in latte e si teneva a 37° C. per 10 giorni. La titolazione si faceva con la soluzione decimale di NaOH su 10 cc. di coagulo ben sbattuto. Per ogni ceppo in esame, venivano innestate contemporaneamente due boccette perchè si è

(1) Ritter W. e Dorner W.: «Zentralbl. f. Bakter.», 1 Abt., Vol. 125, pag. 379

(2) Renco P.: *Ricerche su un fermento lattico sporigeno*. Annali di microbiologia, 1942.

TABELLA B 1

Ceppo n.	Forme microbiche su agar-siero-peptone in anaerobiosi (Wright-Burri mod. Ritter e Dorner)	Forme microbiche su agar-siero-peptone. Da colonie superficiali in aerobiosi	Forme microbiche nel latte magro
1	Bastoncini diritti di forma regolare ed uniformi di $1,8 \times 4-9 \mu$, isolati o riuniti due a due; spesso a forma di V.	Bastoncini di $0,4-0,6 \mu \times 1,5-4,0 \mu$, isolati, due a due o in brevi catenelle, di forma regolare, diritti o leggermente ricurvi.	Bastoncini di $0,9-1,1 \times 3-7 \mu$ isolati o riuniti in brevi filamenti di circa $15-25 \mu$.
3	Bastoncini diritti o leggermente ricurvi di $0,5-1,0 \times 2-7 \mu$, isolati o riuniti due a due, raramente in brevi filamenti che misurano da 15 a 20μ circa.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
5	Come ceppo n. 3	Come ceppo n. 3	Come ceppo n. 1 dal quale differiscono per lo spessore che è di $0,5-0,6 \mu$.
6	Bastoncini diritti, di spessore uniforme di $0,4 \times 3-4 \mu$, isolati, ma per lo più in brevi filamenti.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
7	Come ceppo n. 1, dal quale differiscono per lo spessore che è di circa $1,0 \mu$.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
9	Bastoncini di $0,6-0,8 \times 2-7 \mu$ per lo più ricurvi, isolati o in brevi catene, nelle quali si distinguono i singoli elementi. Pochi irregolarmente ricurvi, attorcigliati e più o meno rigonfiati.	Bast. di $0,4-0,6 \times 2,0-6,0 \mu$ isolati o riuniti due a due o talvolta in brevi catenelle quasi sempre ricurvi, talvolta attorcigliati.	Bastoncini diritti isolati o riuniti due a due di $0,4-0,5 \times 3-5 \mu$.
10	Bastoncini di spessore irregolare di $0,5-0,6$ e' di $0,8-1,0 \mu$ sempre ricurvi, isolati o riuniti due a due.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1
11	Bastoncini diritti o leggermente ricurvi del diametro regolare di $0,6-0,7 \mu$ per lo più lunghi $8-12 \mu$ talvolta riuniti in brevi filamenti di $16-20 \mu$.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 5.
12	Bastoncini diritti assai uniformi di $0,5-0,6 \times 1,5-5 \mu$, isolati, riuniti due a due o in catenelle di tre.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1 dal quale differiscono per i filamenti alquanto lunghi (circa 60μ).
14	Come ceppo n. 12.	Come ceppo n. 12.	Come ceppo n. 1.
15	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.	Bastoncini di $0,8-0,9 \times 3-6 \mu$ diritti, isolati o riuniti due a due, ma per lo più in filamenti di $12-20 \mu$.

TABELLA B₂

Ceppo N.	Forme microbiche su agar-siero-peptone in anaerobiosi (Wright-Burri mod. Ritter e Dorner)	Forme microbiche su agar-siero-peptone. Da colonie superficiali in aerobiosi	Forme microbiche nel latte magro
16	Bastoncini di spessore vario tra 0,4 e 0,9 μ ricurvi attorcigliati e talvolta a forma di spirale. Alcuni irregolarmente rigonfiati.	Come ceppo n. 9.	Come ceppo n. 5.
17	Come ceppo n. 7.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
18	Come ceppo n. 12.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
19	Come ceppo n. 16.	Come ceppo n. 9.	Come ceppo n. 16
20	Come ceppo n. 3 dal quale si differenziano per lo spessore che è di 0,4-0,6 μ .	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 6.
21	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.	Come ceppo n. 1.
31	Bastoncini quasi sempre in filamenti o in catene, ricurvi talvolta in forma di piccoli anelli. Spessore variabile da 0,7 a 1,3 μ .	Bastoncini di 0,3-1,1 \times 1,2-4,0 μ diritti o ricurvi, talvolta attorcigliati, quasi sempre isolati o due a due, raramente riuniti in brevi catene.	Bastoncini da 0,8-1,0 \times 4,0-11,0 μ isolati o riuniti due a due, talvolta in lunghi filamenti.
40	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.
41	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.	Come ceppo n. 31.
42	Come ceppo n. 31, dal quale si differenziano per lo spessore che è uniforme e di 0,7 μ .	Filamenti dello spessore di 0,5-0,6 μ , per lo più ricurvi, raramente attorcigliati.	Come ceppo n. 31.
32	Bastoncini di 0,8-1,2 \times 3,5 μ , tozzi, raramente diritti, per lo più ricurvi, alcuni di questi ultimi ingrossati, a forma di clava.	Come ceppo n. 42.	Bastoncini di 0,8-0,9 \times 3,0-7,0 μ , isolati o riuniti due a due, talvolta in brevi catenelle.
33	Come ceppo n. 32.	Come ceppo n. 42.	Come ceppo n. 32.
34	Come ceppo n. 32.	Come ceppo n. 42.	Come ceppo n. 32.
35	Bastoncini di 0,7-0,8 \times 3-8 μ isolati o riuniti due a due, quasi sempre diritti, raramente un po' ricurvi.	Come ceppo n. 42.	Come ceppo n. 32.
36	Come ceppo n. 35.	Bastoncini di 0,4-0,6 \times 4,9 μ o più quasi sempre diritti, talvolta leggermente ricurvi, isolati o riuniti due a due, raramente in brevi filamenti.	Bastoncini di 0,6-0,9 \times 3-1,2 μ , per lo più isolati, talvolta in brevi filamenti.

TABELLA B₃

Ceppo N.	Forme microbiche su agar-siero-peptone in anaerobiosi (Wrigh-Burri mod. Ritter e Dorner)	Forme microbiche su agar-siero-peptone. Da colonie superficiali in aerobiosi	Forme microbiche nel latte magro
37	Come ceppo n. 35.	Come ceppo n. 36, dal quale differiscono per frequenti catenelle e filamenti.	Come ceppo n. 36.
62	Bastoncini di dimensioni assai regolari di 1,0-1,2 x 3-12 μ , dritti e quasi sempre isolati, raramente riuniti a due a due.	Come ceppo n. 31.	Bastoncini di spessore assai variabile, tra 0,6 e 1,5, lunghi 5-7 μ , dritti, quasi sempre in brevi filamenti.
63	Bastoncini di spessore variabile tra 0,6 e 1,3 μ per lo più lunghi di 10 a 20 μ , un po' ricurvi.	Come ceppo n. 31.	Bastoncini di 0,8-1,0 x 5-7 μ , dritti, quasi sempre isolati, raramente in brevi filamenti.
45	Filamenti del diametro di 0,8-0,9 μ , lunghi per lo più 20-40 μ , leggermente ricurvi.	Filamenti di 0,4-0,8 μ assai lunghi, ricurvi e talvolta attorcigliati.	Bastoncini dritti o leggermente ricurvi di 0,7 x 2-5 μ , isolati o riuniti due a due o in lunghissimi filamenti (più di 100 μ).
46	Filamenti di 0,6-0,9 μ , assai ricurvi e spesso contorti.	Come ceppo n. 45.	Bastoncini dritti o leggermente ricurvi, di 0,7 x 2,5 μ isolati, riuniti due a due o in brevi catenelle.
47	Come ceppo n. 46, dal quale differiscono per alcuni filamenti leggermente ricurvi.	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 45.
48	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 45.
49	Come ceppo n. 46.	Come ceppo n. 45.	Lunghi filamenti del diametro di 0,9-1,0 μ .
50	Come ceppo n. 46.	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 49.
52	Come ceppo n. 46, dal quale differisce per il diametro dei filamenti che è assai costante di 0,6 μ .	Come ceppo n. 45.	Come ceppo n. 49.
53	Brevi filamenti di diametro costante di 0,6 μ , assai contorti ed attorcigliati, talvolta a forma di anello (il diametro degli anelli è in media di 4-5 μ).	Bastoncini di 0,4-0,6 x 2-6 μ , riuniti in brevi catene o in brevi filamenti, quasi sempre ricurvi, raramente attorcigliati.	Come ceppo n. 46.
54	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 49.
55	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 46.
56	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 53.	Come ceppo n. 45.

constatato che, nelle identiche condizioni, lo stesso ceppo produceva gradi di acidità variabili sino a 0,15° Thörner (cc. 1,5 di Na OH decinormale per ogni 10 cc. di terreno).

h) CAPACITA' DI FERMENTARE GLI ALCOLI E GLUCIDI

In un primo tempo fu adoperato il terreno indicato da Kantardjjeff ed adottato anche da Demeter e Schmid (vedi pag. 21), ma questo dovette essere abbandonato perchè molti ceppi si sviluppavano assai stentatamente o non si sviluppavano affatto anche quando veniva addizionato lo zucchero. In seguito fu adoperato, con ottimo successo, il terreno base di Burri e Kollmann parzialmente modificato (vedi pag. 22). Lo zucchero veniva aggiunto in ragione del 2 % al terreno base, che veniva distribuito nelle provette in ragione di 10 cc. cadauna e sterilizzato a 100° C. per 15' per tre giorni consecutivi. Per ogni provetta si innestava un'ansata (fu adoperata un'ansa avente un filo con 0,5 mm. di diametro e il diametro interno dell'occhiello di 2 mm.) di cultura in latte magro freschissima. Dopo 10 giorni di permanenza in termostato a 37° C., si titolava l'acidità prodotta con la soluzione decinormale di idrato di sodio.

La ricerca si ripeteva dopo dieci giorni circa e nei casi dubbi anche due o tre volte. Per ogni esame fu fatta sempre anche una prova di controllo, perchè è risultato che i ceppi acidificavano, se pur leggermente, anche in terreno base non aggiunto di zucchero. Tale produzione di acidità (per la neutralizzazione della quale occorre da 0,2 a 0,8 cc. di Na OH decinormale per ogni 10 cc. di terreno) è quasi sicuramente dovuta a tracce degli zuccheri presenti nel terreno base, zuccheri che non potevano essere eliminati senza pregiudicare l'andamento della ricerca, perchè è stato constatato che, nel terreno base nel quale non si verificava alcuna acidificazione, questa mancava talvolta anche per alcuni zuccheri (come ad es. galattosio, glucosio, maltosio), a spese dei quali, nel terreno base contenente tracce di zuccheri, veniva prodotta una notevole quantità di acidi. Ciò fu constatato anche da Karnicki e Dorner (1) i quali affermano essere noto che alcuni batteri, in presenza di tracce di zuccheri fermentescibili, sono in grado di attaccare sostanze che altrimenti non vengono fermentate o assai debolmente.

Inoltre, nel corso dell'esperienza, veniva osservato un altro fatto di una certa importanza e precisamente che gli stessi ceppi, nelle identiche condizioni di sviluppo, producevano diversi gradi di acidità, acidità che oscillava da 0,01-0,03° Thörner (cioè da 0,1-0,3 cc. di Na OH decinormale necessari per neutralizzare 10 cc. di terreno).

Di questo fatto si è dovuto tener conto nella valutazione della capacità fermentativa dei singoli ceppi, interpretando come dubbi tutti i casi, nei quali la produzione di acidità non superava i 0,3° Thörner in più della stessa, titolata nel terreno base privo di zucchero.

(1) Karnicki e Dorner: *loco cit.*

(2) Grado Thörner = 1 cc. di Na OH normale capace di neutralizzare l'acid. in 100 cc. di liquido.

i) DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' OTTICA DELL'ACIDO LATTICO

Per determinare l'attività ottica dell'acido lattico, bisogna ottenere il lattato di zinco puro. Per tale scopo si procedette nel seguente modo. Si allestirono le culture in circa mezzo litro di latte magro, aggiunto di carbonato di calcio. Dopo dieci giorni di termostato a 40° C. e frequenti agitazioni giornaliere, si scaldavano le culture a bagnomaria e si filtravano. Nel filtrato si attaccava il lattato di calcio coll'acido solforico e si filtrava per allontanare il solfato di calcio, poi si provvedeva all'estrazione dell'acido lattico coll'etere. Eliminato l'etere, per distillazione, si diluiva l'acido lattico così ottenuto, non perfettamente puro, coll'acqua calda e si aggiungeva il carbonato di piombo, scaldando tutto a bagnomaria sino alla neutralizzazione. Si filtrava e dal filtrato si eliminava il piombo coll'idrogeno solforato. Si filtrava nuovamente, si concentrava a bagnomaria sino a scacciare tutto l'idrogeno solforato e si aggiungeva il carbonato di zinco facendo bollire per qualche minuto. Si filtrava e si concentrava il filtrato a piccolo volume al quale si aggiungeva alcool etilico in due riprese (in tutto circa tre volte il liquido contenente il lattato di zinco) e si lasciava raffreddare. Dopo un riposo di almeno cinque ore, si filtrava lavando il precipitato, prima coll'alcol è poi coll'etere. L'etere veniva eliminato in stufa a 55°C. ed il lattato di zinco così ottenuto veniva esaminato al polarimetro.

l) PRODUZIONE DELLA CATALASI

Nelle provette della capacità di circa 20 cc. si allestivano le culture in latte magro o in siero peptone in ragione di 10 cc. di cultura per provetta. Dopo 2 e sei giorni di incubazione a 40° C. si determinava la catalasi nel seguente modo: nella stessa provetta la cultura veniva energicamente agitata dopo l'aggiunta di 5 cc. 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 di sfuggire al liquido spostato dal gas eventualmente formatosi nella provetta capovolta.

La lettura veniva eseguita dopo 5, 12 e 24 ore di permanenza a circa 20° C.

m) DETERMINAZIONE DI TEMPERATURE OTTIME, MINIME E MASSIME DI SVILUPPO

A tale scopo si allestivano culture in latte magro e siero-peptone a temperature 20, 22, 25, 30, 37, 40, 45, 49, 51, 52, 53° c., alle quali si tenevano, per la ricerca delle massime e delle minime temperature di sviluppo, per una durata di quindici giorni. Come indice di temperatura ottima serviva il tempo impiegato per la coagulazione, mentre l'intorbidamento (con il relativo esame microscopico) del siero-peptone indicava temperature minime e massime di sviluppo.

n) RICERCA DEL POTERE PROTEOLITICO

Nei palloncini tarati della capacità di 250 cc. si allestivano le culture in latte intero addizionato di carbonato di calcio precipitato. Il latte proveniente da tre o quattro vacche e munto asetticamente veniva distribuito nei palloncini tarati da 250 cc. in ragione di cc. 100 per ogni palloncino nel quale si trovava carbonato di calcio sterile. Il latte venne sterilizzato per tre volte in tre giorni a vapore fluente per 15' alla volta. Per la prova della sterilità i palloncini rimasero a 31° per 15 giorni; dopo di che vennero innestati tutti con una cultura fresca in latte magro in ragione di 1 cc. di cultura per ogni palloncino.

Per le prove in bianco si procedette immediatamente alla determinazione dell'azoto solubile, mentre gli altri palloncini vennero tenuti per 24 ore a 40° C e 24 ore a 30° C. ed agitati in media ogni tre ore.

In seguito le culture così ottenute vennero tenute alla temperatura di 18-20° C. e giornalmente per tre o quattro volte agitate.

Dopo di ciò si eseguì la ricerca dell'azoto solubile con il metodo Kjeldahl sul filtrato limpido, dopo aver precipitato i protidi a caldo coll'aggiunta di acido acetico.

4. - Risultati delle ricerche

a) FORMA DELLE COLONIE SULLA SUPERFICIE DELL'AGAR-SIERO-PEPTONE IN AEROBIOSI

Sono stati notati sostanzialmente cinque tipi che si differenziano tra loro più o meno spiccatamente:

- A) Colonie sottili, rotonde, bianchicce e trasparenti. Diametro circa 0,5-0,7 mm. A 10_x, struttura uniforme o finemente cristallina, margine quasi sempre liscio, talvolta un po' ondulato. Sono più o meno iridescenti.
- B) Colonie assai simili al tipo A, dal quale differiscono per la struttura nettamente cristallina.
- C) Colonie rotonde, bianchicce e trasparenti, del diametro di circa 1 mm., con il margine più o meno spiccatamente ispessito a forma di anello. A 10_x, il centro sembra vuoto o di struttura nettamente cristallina; il margine ispessito a forma di anello è liscio o leggermente ondulato verso l'esterno. A 90_x, risultano uniformemente e finemente cristalline (come del resto tutte le colonie dei termobatteri) un po' più trasparenti verso il centro.
- D) Colonie rotonde, bianche e spesse del diametro di mm. 1 abbondante. A 10_x presentano la struttura nettamente cristallina a margine liscio.
- E) Colonie di forma irregolare, sottili, bianchicce e trasparenti. Diametro di circa un mm. A 10_x, tipo « caput medusae » cioè presentano i prolungamenti a forma di masse di capelli ondulati.
- F) Colonie rotondeggianti, sottili e trasparenti con il d = 1,5-2 mm. A 10_x, il centro grossolanamente cristallino è più trasparente del margine che ri-

sulta finemente granuloso e lobato. A 90x, struttura finemente granulosa con linee ricurve più scure, margine debolmente ed irregolarmente lobato.

Alla osservazione microscopica tutti i tipi, eccetto D, sono caratterizzati dalla trasparenza, dovuta ad uno spessore estremamente ridotto. Si suppone che ciò sia dovuto alla non buona tolleranza di ossigeno, perchè, sullo stesso terreno in anaerobiosi, le colonie si presentano quasi sempre alquanto spesse.

b) FORMA DELLE COLONIE SULLA SUPERFICIE DELL'AGAR-SIERO-PEPTONE IN ANAEROBIOSI (chiusura anaerobica di Wright-Burri, modificata da Ritter e Dorner).

Sono stati riscontrati otto tipi di colonie che però, macroscopicamente, presentano assai lievi differenze; queste diventano più nette quando vengono osservate a dieci ingrandimenti.

AA - Colonie rotonde, bianche, spesse, a forma di goccia, con lucentezza umida, del diametro di 1-1,5 mm. A 10x mostrano margine liscio e struttura:

- a) finemente cristallina;
- b) grossolanamente cristallina;
- c) uniforme.

BB - Colonie rotondeggianti di colore bianco-giallo sporco, più spesse verso il centro, dove assumono la colorazione più intensa. Il diametro è di 1-2 mm. A 10x presentano il margine ondulato e struttura:

- a) finemente cristallina;
- b) grossolanamente cristallina.

CC - Colonie rotonde, a forma di disco, di spessore uniforme, assai sottili, quasi trasparenti. A 10x, struttura finemente cristallina.

DD - Come AA., solamente più grandi (d = 2 mm.), più spesse e non perfettamente rotonde. A 10x struttura finemente cristallina.

EE - Colonie rotonde, bianchicce, con il margine ispessito e con il centro quasi trasparente, in modo da assumere la forma di anello. A 10x il centro sembra vuoto o assai sottile con struttura granulosa; verso l'esterno il margine presenta i contorni ondulati. Sono quasi uguali al tipo C (che si riscontra sullo stesso terreno in aerobiosi).

c) FORME MICROBICHE NELLE COLONIE SUPERFICIALI NELL'AGAR-SIERO-PEPTONE

Le forme microbiche provenienti dalle colonie ottenute, dai vari ceppi, in aerobiosi ed anaerobiosi, non presentano in genere grandi differenze. Unica sostanziale differenza consiste nel fatto che alcuni ceppi formano, in anaerobiosi, colonie, nelle quali si presentano come bastoncini di forma e dimensioni assai regolari, diritti o riuniti a due a due, il che non si

verifica mai per le forme provenienti dalle colonie sviluppatesi in aerobiosi. In quest'ultimo caso i bastoncini della stessa colonia sono talvolta diritti, talvolta un po' ricurvi e non di rado uniti in catenelle.

Le forme che hanno l'assoluta predominanza tanto nelle colonie in aerobiosi, quanto in anaerobiosi, sono i bastoncini per lo più riuniti in catenelle o filamenti più o meno ricurvi, talvolta contorti o attorcigliati anche a forma di anello. Non mancano neppure le forme irregolarmente rigonfiate. Lo spessore dei bastoncini è assai vario: alcuni sono relativamente sottili (circa 0,4 micron) altri relativamente spessi (1,2 micron).

Come risulta dalla tabella B le forme di quasi tutti i ceppi, provenienti dalle colonie sviluppatesi in aerobiosi, presentano differenze più o meno forti con le forme degli stessi ceppi provenienti dalle colonie ottenute in anaerobiosi.

d) FORME MICROBICHE NEL LATTE MAGRO.

Anche nel latte magro, come risulta dalla tabella B, i termobatteri prendono diverse forme. Generalmente si presentano sotto forma di filamenti più o meno lunghi, accompagnati da un numero più o meno forte di bastoncini isolati. Altre volte invece formano catene più o meno lunghe nelle quali si possono distinguere bene i singoli bastoncini; le catene generalmente non sono numerose e risultano circondate da molti bastoncini per lo più isolati o riuniti a due a due.

Non mancano infine ceppi che si presentano solamente come bastoncini isolati o riuniti due a due. Anche in questo caso lo spessore dei bastoncini è alquanto vario. Non sono state mai riscontrate forme ipertrofiche o attorcigliate.

Non succede di rado che lo stesso ceppo, nelle identiche condizioni di temperatura, terreno nutritivo ed in genere in tutte le altre condizioni di sviluppo si presenti, in una provetta, sotto forma di bastoncini isolati o riuniti due a due, mentre, nell'altra, sotto forma di filamenti. Detto caso, ripetutamente osservato, riguarda in particolar modo il ceppo 16. Lo scrivente ha riscontrato un analogo comportamento in un ceppo appartenente al *Tbm. bulgaricum* isolato dallo jogurt originale, proveniente dalla Bulgaria.

e) ACIDIFICAZIONE DEI GLUCIDI E DEGLI ALCOLI

Come risulta dalla tabella, la capacità dei singoli ceppi di acidificare i glucidi ed alcoli è la seguente: tutti i ceppi esaminati, cioè 40, producono acidità, dal glucosio, mannosio e lattosio, 37 anche da galattosio (ad eccezione dei ceppi n. 53-54 e 55 che non fermentano quest'ultimo zucchero) e 33 ceppi acidificano anche il levulosio. Un discreto numero (precisamente 17) acidifica, oltre ai suddetti zuccheri, anche il saccarosio, mentre, solo 12 ceppi, sono capaci di attaccare il maltosio, seppure solo pochi con una certa intensità; del resto l'acidità prodotta da questi ultimi zuccheri è in genere assai basso. Questo basso grado di acidità si nota anche nei riguardi dei seguenti glucidi: xilosio, raffiniosio, destrina, amido e salicina.

Acidità prodotta dai

(cc. di NaOH decinormale)

CEPPO	Glicerina	Xiloso	Arabinosio	Ramnosio	Sorbito	Mannite	Levulosio	Glucosio	Mannosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Rafinosio	Imbinulina	Destrina	Amide	Salicina
1	—	—	—	—	—	—	3.2	6.4	10,2	6.8	—	0.6	9.2	—	—	0.4	—	—
3	—	—	—	—	—	—	4.8	5.3	3.5	5.1	—	0.1	8.3 7.0	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	7.2	6.3	10,2	6.2	—	—	9.6	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	1.0	4.2 6.0	3.1	—	—	3.8	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	2.6	5.8	2.6	6.3	—	1.4	7.9	—	—	0.5	—	—
9	—	1.2	—	—	—	—	2.0 2.3	9.2	1.6 3.6	9.1	—	1.5	4.3 7.0	0.2	—	1.6	0.3	—
10	—	—	—	—	—	—	3.4	7.4	4.2	7.1	—	0.6	6.7	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	4.1	8.0	7.0	7.1	—	—	4.8	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	3.4	7.2	4.1	6.8	—	—	4.5	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	2.5	9.8	3.2	10,8	—	0.8	7.6	—	—	0.4	—	—
15	—	—	—	—	—	—	3.9	7.1	3.3	7.6	—	—	13,2	—	—	—	—	—
16	—	0.3	—	—	—	—	2.0	6.3	3.0 3.4	6.0	—	0.3 1.5	4.4	—	0.6	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	6.4	10,2	9.0	11	—	0.6	13,8	—	—	0.4	—	—
18	—	—	—	—	—	—	8.2	7.4	4.4	6.3	—	—	13,2	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—	1.6	8.5	1.6	8.9	—	—	5.1	—	—	0.6	—	—
20	—	—	—	—	—	—	6.8	9.8	3.3	12,6	—	—	13,4	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	—	—	8.6	7.1	6.5	—	—	10,4	—	—	—	—	0.2
31	—	1.5	—	—	—	—	1.9	6.4	3.4	4.7	1.9 5.1	1.7	7.0	—	—	—	—	0.2
40	—	1.5	—	—	—	—	1.6	7.1	1.4	8.4	5.6	2.0	6.8	—	—	—	—	—
41	—	0.5	—	—	—	—	2.0	3.2	1.4	5.1	4.5	4.8	6.2	—	—	—	—	0.2

glucidi ed aleoli

per 10 cc. di terreno nutritivo)

CEPPO	Glicerina	Xilolo	Arabinosio	Ramnosio	Sorbito	Mannite	Levulosio	Glucosio	Mannosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio	Refinosio	Inulina	Destrina	Amido	Salicina
42	—	1.5	—	—	—	—	2.0	4.2	1.4	7.2	5.3	4.5	6.9	—	—	—	—	0.2
32	—	—	—	—	—	—	2.4	6.1	7.2	6.8	—	0.5	7.1	—	—	1.6	—	—
33	—	—	—	—	—	—	2.6	5.9	5.7	6.6	—	0.5	8.0	—	—	1.6	—	—
34	—	—	—	—	—	—	1.4	4.5	3.4	4.6	0.2	0.2	6.2	—	—	0.5	—	—
35	—	—	—	—	—	—	2.4	5.8	6.0	7.6	0.3	0.2	6.2	—	—	1.0	—	—
36	—	—	—	—	—	—	7.4	7.2	6.7	7.2	—	0.8	8.0	—	—	1.0	—	—
37	—	—	—	—	—	—	6.6	6.4	8.8	6.9	—	—	9.2	—	—	—	—	—
62	—	—	—	—	—	—	—	2.2	3.4	3.3	—	—	7.1	—	—	—	—	—
63	—	—	—	—	—	—	—	2.5	3.9	3.6	—	—	6.3	—	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	—	0.6	3.2	5.2	5.2	1.1	0.2	6.2	—	—	0.5	1.3	—
46	—	—	—	—	—	—	0.5	2.1	4.7	4.6	1.2	0.3	5.1	—	—	—	—	—
47	—	—	—	—	—	—	0.5	1.9	5.1	4.1	0.9	0.4	5.8	—	—	0.6	0.9	—
48	—	—	—	—	—	—	0.8	2.5	4.2	4.6	0.8	0.2	6.1	—	—	0.5	0.7	—
49	—	—	—	—	—	—	1.2	2.2	3.9	4.4	1.3	0.2	5.8	—	—	0.7	1.1	—
50	—	—	—	—	—	—	0.6	2.1	4.8	4.7	1.2	0.2	6.3	—	—	—	—	—
52	—	—	—	—	—	—	0.6	2.3	4.1	3.9	1.3	—	4.9	—	—	0.6	1.2	—
53	—	—	—	—	—	—	0.5	3.1	5.6	0.3 0.1	1.7	0.3	5.3 4.1	—	—	0.5	0.5	—
54	—	—	—	—	—	—	0.9	2.1	3.9	0.4	1.6	—	5.7	—	—	—	—	—
55	—	—	—	—	—	—	1.0	2.4	4.7	0.2	1.5	0.3	4.5	—	—	0.6	0.5	—
56	—	—	—	—	—	—	0.9	2.3	4.9	0.2	1.3	0.4	2.8	—	—	0.6	0.5	—

Senza tener conto dell'intensità di acidificazione, e, considerando i casi dubbi senz'altro come negativi, (dato il grado di acidità da loro prodotta assai basso) i ceppi esaminati si possono dividere nei seguenti undici gruppi:

<i>Gruppi</i>	<i>Sostanze fermentate</i>	<i>N. dei ceppi</i>
I	6-21-62-63 Glucosio, mannosio, galattosio, lattosio	4
II	3-5-11-12-15-18-20-37 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, lattosio	8
III	10-46-50-54 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, lattosio	4
IV	34-35 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, lattosio, destrina	2
V	53-55-56 Levulosio, glucosio, mannosio, saccarosio, lattosio, destrina, amido	3
VI	1-7-14-17-32-33-36 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio, destrina	7
VII	45-47-48-49-52 Levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, lattosio, destrina, amido	5
VIII	31-40-41-42 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio	4
IX	16 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio, inulina	1
X	19 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, lattosio, destrina	1
XI	9 Xilosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, maltosio, lattosio, destrina	1

f) QUALITA' DELL'ACIDO LATTICO PRODOTTO

Dato il procedimento assai lungo e di valore alquanto relativo (vedi pag. 15) che si attribuisce oggi all'attività ottica dell'acido lattico prodotto dalle singole specie, questa è stata determinata solo per quattro ceppi considerati per l'assieme di altri caratteri i più tipici.

Nella tabella sono riportati i risultati

<i>Ceppo N.</i>	<i>Lattato di zinco sciolto in 100 cc. di acqua - gr.</i>	<i>Acqua di cristallizzazione %</i>	<i>Angolo di deviazione</i>	<i>Lunghezza del tubo 400 mm. Temperat. di osservazione 25° C.</i>
9	1,1244	13,96	+ 0,42	
53	1,0730	13,42	+ 0,41	
47	1,2929	13,61	+ 0,53	
34	1,1725	11,59	0,00	

Dalla tabella risulta che i ceppi n. 9, 53 e 47 producono acido lattico levogiro, mentre il ceppo n. 34 acido lattico inattivo.

g) IL POTERE PROTEOLITICO

La capacità di solubilizzare la caseina del latte è stata ricercata per otto ceppi, scelti tra quelli più numerosi e più frequenti che si riscontravano nel siero-fermento. Dopo una serie di prove preliminari, furono allestite le culture in latte intero sterile ed aggiunto di carbonato di calcio precipitato. Dopo aver ottenuto un energico sviluppo dei microbi tenendo per 24 ore il latte innestato a 40° e poi per altre 24 ore a 30°, le culture furono lasciate per sei settimane a 18-20° C. (temperature alle quali i ceppi in esame non presentavano più alcuno sviluppo).

Come risulta dalla tabella tutti gli otto ceppi hanno attaccato le proteine del latte portando l'azoto solubile dello stesso da 0,061-0,065 % (presente nel latte al momento di innesto) a un minimo di 0,111 % e ad un massimo di 0,218 %.

<i>Ceppo N.</i>	<i>% di N solubile nella cultura in latte + CaCO₃</i>	<i>% di N solubile nel latte adoperato per la cultura</i>	<i>Ceppo N.</i>	<i>% di N solubile nella cultura in latte + CaCO₃</i>	<i>% di N solubile nel latte adoperato per la cultura</i>
16	0,164	0,065	34	0,159	0,065
31	0,161	0,065	35	0,191	0,061
42	0,176	0,065	45	0,111	0,061
52	0,218	0,065	62	0,192	0,061

h) LA CATALISI E LA RIDUZIONE DEI NITRATI

Nessuno dei ceppi studiati ha mai dato luogo alla produzione della catalasi, altrettanto non si è avuta in alcun caso la riduzione dei nitrati in nitriti.

i) LA PRODUZIONE DEI GRANULI METACROMATICI O DI VOLUTINA

Come risulta dalla tabella n. 5 alcuni ceppi contengono granuli metacromatici. Si è potuto constatare che la produzione di detti granuli risulta costante.

k) LA TEMPERATURA DI SVILUPPO E LA PRODUZIONE DI ACIDO LATTICO

Per tutti i ceppi le temperature minime di sviluppo oscillavano tra i 20 e 22° C., mentre le massime tra i 49-52° C.

Come risulta dalla tabella n. 5 una particolare attenzione è stata fatta ai ceppi capaci di svilupparsi ancora a 51° C., temperatura tenuta in massima considerazione da Burri e Kollmann agli effetti della classificazione dei singoli ceppi. Si è potuto constatare, dopo un anno circa di trapianti, che tutti i ceppi studiati si comportavano in modo assai costante nei riguardi delle temperature massime di sviluppo.

La quantità di acido lattico risulta relativamente poco forte ed in generale il gruppo si presenta abbastanza omogeneo. Come risulta dalla tabella n. 5 l'acidità minima prodotta nel latte è stata di 12,8° Thörner per il ceppo 52, mentre la massima era di 37,1° Thörner per il ceppo 35. Costantemente e notevolmente più bassa è stata l'acidità prodotta nel siero-peptone.

5. - Classificazione di ceppi isolati

Secondo Orla Jensen (4) la differenza sostanziale che permette di distinguere le singole specie dei termobatteri consiste nella capacità di fermentare determinati glucidi ed alcoli con la formazione di acido lattico. Altre differenze riguardano la qualità e quantità dell'acido lattico prodotto, la forma delle colonie e la produzione di granuli di volutina.

Ecco le caratteristiche dei singoli termobatteri secondo Orla Jensen (1).

Tbm. lactis:

- a) acidifica galattosio, mannosio, saccarosio, maltosio, lattosio e salicina;
- b) produce acido lattico levogiro con un massimo di 1,7 %;
- c) non produce quasi mai colonie tipo « caput medusae ».

Tbm. helveticum - differisce dal *Tbm. lactis* perchè:

- a) non fermenta mai saccarosio, raffinosisio, inulina e salicina, ma fermenta sempre maltosio, destrina e amido;
- b) produce acido lattico inattivo con un massimo di 2,0-2,75 %;
- c) forma colonie quasi sempre del tipo « caput medusae ».

(1) S. Orla Jensen: *loco cit.*

Tbm. intestinale - differisce dal *Tbm. lactis* perchè:

- a) produce acido lattico inattivo puro o con un'aggiunta di levogiro;
- b) produce colonie del tipo « caput medusae ».

Tbm. jugurt - differisce dal *Tbm. helveticum* perchè:

- a) non fermenta maltosio, destrina e amido;
- b) produce acido lattico inattivo con un massimo di 2,7 %;
- c) non produce granuli.

Tbm. bulgaricum - differisce dal *Tbm. jugurt* perchè:

- a) produce al massimo 1,7% di acido lattico;
- b) produce acido lattico levogiro;
- c) è ricco di granuli;
- d) dà quasi sempre colonie del tipo « caput medusae ».

Secondo Burri e Kollmann (1) le differenze sostanziali tra il *Tbm. lactis* e il *Tbm. helveticum* non esistono nella capacità di fermentare i singoli zuccheri e neppure nella qualità dell'acido lattico prodotto, ma soprattutto nella forma delle colonie ottenute in anaerobiosi, nella forma dei bastoncini provenienti dalle stesse, nella temperatura di sviluppo e nella produzione massima di acidità.

Ecco le caratteristiche delle due specie sopramenzionate:

Tbm. helveticum:

- a) colonie di struttura grossolanamente cristallina (nelle forme normali: p. 410 (*));
- b) bastoncini presentano un costante spessore di circa 1 micron di varia lunghezza e rinfangono fortemente la luce (non sempre p. 411);
- c) nel latte magro sterile producono non meno del 2 % di acidità espressa in acido lattico (vi sono rare eccezioni p. 412);
- d) nel siero-peptone a 51° C. non si ha alcun sviluppo (in nessun caso p. 412);
- e) fermenta regolarmente destrosio, mannosio, galattosio, maltosio e destrina.

Tbm. lactis:

- a) le colonie sono di aspetto assai vario, ma nel caso tipico sono sottili a forma di lastra con struttura finemente cristallina o sabbiosa;
- b) al microscopio i microbi provenienti dalle colonie rinfangono poco la luce e presentano forma più o meno contorta a mò d'onda (non sempre p. 416);

(1) Burri e Kollmann: *loco cit.*

(*) Il n. indica la pagina del lavoro citato.

TABELLA

C.E.P.O. N.	Tempo di coagulazione a 40° C. - in ore	Sviluppo nel Siero-peptone a 51° C	Acidità nel latte magro (Gradi Thörner)	Acidità nel Siero-Peptone (Gradi Thörner)	Forme delle colonie in anaerobiosi (Wrigt-Burri)	Forme delle colonie superficiali in aerobiosi	Produzione di granuli
1	8	—	16.2	7.5	AA a	A	—
3	9	—	19.1	9.4	AA a	B	—
5	5	—	19.0	9.8	AA a	A	—
6	8	—	16.0	8,1	BB a	A	—
7	9	—	17.5	8.4	AA a	A	—
9	8	+	18.0	6.2	F	C	+
10	10	—	17.0	8.4	BB b	B	—
11	10	—	16.2	6.7	AA b	A	—
12	10	—	14.1	7.8	BB a	A	—
14	9	—	14.2	8.7	BB a	B	—
15	10	—	17.9	9.1	CC	—	—
16	10	+	18.0	6,4	FF	C	+
17	10	—	17.2	9.3	AA a	A	+
18	10	—	15.2	8.2	BB a	A	—
19	9	+	16.9	9.2	FF	C	+
20	10	—	16.2	7.2	BB a	B	—
21	9	—	15.5	9.4	AA a	A	—
31	9	+	14.1	7.6	AA c	F	+
40	10	+	18.8	8.8	AA c	F	+
41	10	+	14.8	7.8	AA c	F	+

O a. a. z. u c	Tempo di coagulazione a 40° C. - in ore	Sviluppo nel Siero peptone a 51° C	Acidità nel latte magro (Gradi Thörner)	Acidità nel Siero Peptone (Gradi Thörner)	Forme delle colonie in anaerobiosi (Wright-Burri)	Forme delle colonie superficiali in aerobiosi	Produzione di granuli
42	10	+	19.8	9.3	AA c	E e F	+
32	7	—	32.0	11.8	AA a	F	—
33	8	—	32.6	11.3	AA a	F	—
34	8	—	28.0	10.2	AA b	F	—
35	7	—	37.1	11.8	BB b	F	—
36	8	—	29.8	12.1	AA a	A	—
37	8	—	31.2	12.5	AA a	B e E	—
62	7	—	31.3	11.0	DD	D	—
63	7	—	33.1	10.1	DD	A e D	—
45	9	+	16.4	7.9	AA b	A	+
46	8	+	17.6	12.1	AA a	A e E	+
47	9	+	13.8	7.5	AA b	A e E	+
48	9	+	13.2	7.6	AA b	A	+
49	9	+	13.5	7.1	AA b	A	+
50	9	+	16.9	9.8	AA a	A	+
52	8	+	12.8	7.8	AA a	A	+
53	9	+	14.2	7.3	AA c	A e E	+
54	9	+	17.1	9.1	AA a	A	+
55	9	+	15.4	7.7	AA c	A	+
56	8	+	14.7	7.4	AA c	A	+

- c) nel latte magro sterile a 38° C. l'acidità media prodotta espressa in acido-lattico oscilla attorno 1,5% e non raggiunge mai il 2% (p. 416);
- d) in siero-peptone a 51° C. si sviluppa ancora (non sempre p. 417);
- e) fermenta regolarmente: destrosio, mannosio, galattosio e lattosio; irregolarmente: levulosio, saccarosio, maltosio, destrina e salicina.

Leggendo attentamente il lavoro di Burri e Kollmann risulta che i sopraindicati caratteri non si trovano costantemente presso tutti i ceppi appartenenti al *Tbm. lactis* e *Tbm. helveticum* ad eccezione di due precisamente: il *Tbm. helveticum* non si sviluppa in nessun caso a 51° C. e il *Tbm. lactis* non arriva mai a produrre il 2 % di acido lattico.

Volendo classificare i ceppi esaminati nel presente lavoro - secondo le indicazioni di Burri e Kollmann ed anche quelle di Orla Jensen - la questione non si presenta molto facile, inquantochè molti ceppi presentano caratteristiche talvolta proprie del *Tbm. lactis*, talvolta del *Tbm. helveticum*.

Prendendo come base la classificazione di Burri e Kollmann solo due sono caratteri assolutamente costanti, come già stato detto, presso i ceppi appartenenti al *Tbm. helveticum* e precisamente la mancanza dello sviluppo a 51° per quest'ultimo e la produzione dell'acidità in quantità inferiore al 2% per il primo; però anche questi da soli hanno un valore relativo, perchè la mancanza dello sviluppo a 51° C. non esclude l'appartenenza al *Tbm. lactis*, come anche la produzione dell'acidità inferiore al 2% al *Tbm. helveticum*. Perciò tenendo conto delle caratteristiche indicate per le suddette specie e cioè : forma delle colonie, forma dei microbi, capacità di fermentare gli zuccheri, ecc. si crede che non sia necessario che concordino tutte.

Tra i ceppi esaminati possono essere classificati senz'altro come *Tbm. lactis* i seguenti: 18, 9, 16, 19, 31, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52; 53, 54, 55, 56 inquantochè posseggono tutti i caratteri indicati dai suddetti AA.; eventualmente si dovrebbero escludere i ceppi 53-55-56 perchè incapaci di fermentare il galattosio.

Come *Tbm. helveticum* può essere classificato senza dubbio uno solo e precisamente il ceppo 35.

Come *Tbm. lactis* sono da escludersi senz'altro i ceppi 32, 33, 34, 36, 37, 62, 63: per la produzione di acido lattico che supera di parecchio il 2 %; questo fatto e la mancanza dello sviluppo a 51° C. li fa assomigliare molto al *Tbm. helveticum*, pur mancando alcuni altri caratteri indicati da Burri e Kollmann.

Dei rimanenti 14 ceppi, tre e precisamente 10, 11, 12 potrebbero in certo qual modo classificarsi nella cerchia del *Tbm. helveticum* per la mancanza dello sviluppo a 51° C., per la forma delle colonie e dei bastoncini stessi, pur mancando la produzione di acidità superiore al 2 %; mentre gli altri 11 e cioè 1, 3, 5, 6, 7, 14, 15, 17, 18, 20, 21, dovrebbero considerarsi piuttosto come forme vicine al *Tbm. lactis* perchè, pur non sviluppandosi a 51° C., l'acidità da loro prodotta è inferiore al 2 % e le colonie, nonchè le forme microbiche, non presentano i caratteri di quelle del *Tbm. helveticum*.

Risulta dunque che di 40 ceppi esaminati, solo 16 posseggono tutte le caratteristiche necessarie per poter essere classificati - secondo Burri e Koll-

mann - come *Tbm. lactis* (15 ceppi) e come *Tbm. heiveticum* (1 ceppo). I rimanenti, pur possedendo la maggioranza dei caratteri di una delle suddette specie, non possono essere definiti con sicurezza come tali.

Più difficile diventa la classificazione - nel presente caso - seguendo le indicazioni di Orla Jensen (1) perchè, tra i caratteri principali, è da considerarsi - oltre alla capacità di fermentare gli zuccheri -, la qualità ottica di acido lattico. Ora quest'ultima non è stata determinata che per quattro ceppi per il fatto che i metodi sono piuttosto lunghi ed assai poco adatti quando si tratta di applicarli a parecchie decine di ceppi e perchè il valore diagnostico di queste caratteristiche fermentative, alquanto contrastato (v. pag. 15). Tenendo presente soprattutto la capacità di fermentare gli zuccheri e precisamente il maltosio ed il saccarosio, sei ceppi (31, 40, 41, 42, 47, 56) potrebbero classificarsi come *Tbm. lactis* o almeno molto simili ad esso e dieci ceppi (1, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 32, 33, 36) come *Tbm. helveticum*, perchè capaci di fermentare solamente il maltosio, ma non il saccarosio.

Però, volendo seguire con precisione le indicazioni di Orla Jensen, neppure i suddetti ceppi possono considerarsi senz'altro come *Tbm. helveticum* e *Tbm. lactis* perchè, per alcuni appartenenti al primo, manca la capacità di fermentare amido e destrina, e tutti i sei classificati come *Tbm. lactis* non fermentano affatto la salicina, oppure così debolmente da rendere questa capacità dubbia.

Il ceppo 9 dovrebbe essere addirittura escluso come ceppo del *Tbm. helveticum*, perchè produce acido lattico levogiro, mentre l'appartenenza al *Tbm. lactis* del ceppo 47 viene confermata anche dall'acido lattico levogiro da esso prodotto.

Se, infine, si dovesse prendere in considerazione la quantità di acido lattico prodotto a spese del maltosio e saccarosio, ben pochi ceppi rimarrebbero classificati come *Tbm. lactis* e *Tbm. helveticum* (vedi pag. 15).

Degli altri rimanenti 24 ceppi, 15 non fermentano nè saccarosio, nè maltosio e 9 solo saccarosio e non il maltosio. Dei primi 15, uno (il 19) può essere classificato come *Tbm. bulgaricum* per la produzione di acidità inferiore all'1,7% e per la presenza di granuli, 5 ceppi (34, 35, 37, 62, 63) come *Tbm. jugurt* per mancanza di granuli ed alta produzione di acidità. Inoltre il ceppo 34 produce acido lattico inattivo mentre gli altri 9 ceppi (3, 5, 6, 11, 12, 15, 18, 20, 21) non si possono considerare nè *Tbm. bulgaricum*, nè *Tbm. jugurt* per la mancata produzione di granuli e per la bassa percentuale di acido lattico prodotto.

A questo punto si rende necessario far presente che le culture pure di questi ceppi classificati come *Tbm. bulgaricum* e *Tbm. jugurt*, allestite in latte sterilizzato e pastorizzato, separatamente o in simbiosi con un ceppo dello *Str. thermophilus* isolato dello jogurt, non hanno mai dato luogo al caratteristico e gradevole sapore dello jogurt.

E' un fatto questo che non dovrebbe venir trascurato nelle classificazioni in quanto, nel caso specifico, più che la capacità di fermentare determinati idrati di carbonio o quella proteolitica, conta la produzione di sostanze aromatiche che, all'avviso dello scrivente, dovrebbero essere tenute nella massima considerazione, e perciò studiate a fondo, particolarmente

quando si tratta dei ceppi isolati dai lattici fermentati ai quali questi ceppi conferiscono le caratteristiche fondamentali.

Così, anche i rimanenti ceppi 45, 46, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, non posseggono tali caratteri da poterli annoverare tra le specie di Orla Jensen; per la loro capacità di fermentare il saccarosio e non il maltosio, potrebbero eventualmente essere considerati assai vicini al *Tbm. bulgaricum*, dato che l'acidità prodotta alle spese del saccarosio è assai bassa e data la produzione di granuli nonchè la bassa quantità di acido lattico prodotto nel latte magro.

Ciò vale particolarmente per il ceppo 53, per il quale è stata trovata la produzione di acido lattico levogiro.

CONSIDERAZIONI FINALI

Forma delle colonie. — Diversi tipi di forme delle colonie, riscontrati dallo scrivente, non presentano sostanziali differenze da quelli descritti dagli A.A. che si occuparono dell'argomento.

Da quanto è stato esposto, risulta che le colonie superficiali nell'agar-siero-peptone presentano generalmente un aspetto diverso, secondo se il loro sviluppo ha luogo in aerobiosi od in anaerobiosi; solo per un piccolo gruppo di ceppi queste risultano quasi uguali.

Le differenze sostanziali consistono soprattutto nello spessore, talvolta nel diametro ed anche nella struttura nonchè nella conformazione del margine.

In anaerobiosi, le colonie sono sempre più spesse (perciò presentano la colorazione più decisa), più o meno lucenti e talvolta anche più larghe; inoltre non presentano mai la forma del cosiddetto « caput-medusae ».

Ciò è sostanzialmente confermato da Orla Jensen (1), il quale scrive che i termobatteri formano negli strisci strati assai sottili ed in qualche caso non crescono affatto. Il che non collima colle ricerche di Karnicki e Dorner (2), i quali hanno trovato i 5 tipi di colonie da loro descritti tanto in aerobiosi quanto in anaerobiosi; in più — per alcuni ceppi (particolarmente quelli classificati come *Tbm. lactis*) — le colonie ottenute in aerobiosi, risultano uguali a quelle sviluppatesi in anaerobiosi.

Le colonie, d'altra parte, non risultano caratteristiche per singole specie di termobatteri, il che concorda con i risultati ottenuti da Karnicki e Dorner. Sostanzialmente si può dire che i tipi di colonie riscontrati da questi A.A. rispondono pressochè a quelli trovati dallo scrivente, ad eccezione del tipo « FF » che essi non hanno descritto.

I ceppi classificati come *Tbm. lactis* o simili, seguendo la classificazione di Burri e Kollmann (3), danno luogo a colonie assai simili a quelle descritte dagli stessi A.A. per i suddetti ceppi, la descrizione delle quali, del resto, risponde in linea generale a quella riportata dello scrivente.

Inoltre, l'unico ceppo sicuramente classificato come *Tbm. helveticum* presenta il tipo di colonie caratteristiche descritte dagli A.A. sopra menzionati.

Per ciò che riguarda i ceppi non perfettamente identificabili come *Tbm.*

(1) Orla Jensen : *loco cit.*

(2) Karnicki e Dorner : *loco cit.*

(3) Burri e Kollmann : *loco cit.*

helveticum, ma assai vicini ad esso, solo tre (precisamente n. 10-11-34) presentano colonie caratteristiche di questo, mentre gli altri sette (n. 12-32-33-36-37-62-65) danno luogo a colonie di struttura finemente granulosa, tipiche del *Tbm. lactis*.

Orla Jensen (1) dà poche indicazioni nei riguardi delle forme delle colonie ed anche queste non collimano sempre con alcuni dati riscontrati dallo scrivente. Infatti, due dei tre ceppi (n. 9-47-53) che hanno prodotto acido lattico levogiro, hanno dato luogo alla formazione di colonie del tipo « caput medusae », mentre, secondo Orla Jensen, ciò non si verifica che eccezionalmente; d'altronde il ceppo n. 34, unico esaminato nei riguardi della produzione dell'acido lattico, acido che è risultato otticamente inattivo, non ha dato colonie del suddetto tipo, il che presenta un altro contrasto con le affermazioni dello stesso A.

Forme microbiche. — Le forme microbiche riscontrate dallo scrivente nel latte e sull'agar-siero-peptone, sembrano identiche a quelle descritte dagli altri A.A.

E' da notare però che, mentre la gran parte di questi non trova differenze per i singoli ceppi appartenenti a specie diverse, Burri e Kollmann affermano che il *Tbm. helveticum* si presenta sotto forme caratteristiche e ben diverse da quelle del *Tbm. lactis*. I risultati delle presenti ricerche concordano solo parzialmente con le suddette affermazioni; infatti, mentre è stato riscontrato che le forme dei ceppi classificati come *Tbm. lactis* (tanto seguendo le indicazioni di Burri e Kollmann quanto quelle di Orla Jensen) non presentano mai i caratteri descritti dai suddetti A.A. per il *Tbm. helveticum*, i ceppi classificati come quest'ultimo (secondo Orla Jensen) si presentano non di rado simili a forme che dovrebbero essere proprie del *Tbm. lactis* (precisamente i ceppi n. 10-16-32-33).

Seguendo invece la classificazione di Burri e Kollmann, l'unico ceppo classificato come *Tbm. helveticum*, presenta le forme caratteristiche indicate dai detti A.A.; d'altra parte la metà dei ceppi considerati come simili al *Tbm. helveticum*, non dà forme aventi i caratteri di quest'ultimo.

Per ciò che riguarda lo spessore e la formazione dei filamenti, i risultati del presente lavoro concordano, in linea generale, con le affermazioni della quasi totalità degli A.A.; esiste solo qualche contrasto con quanto scrive Orla Jensen. Secondo quest'ultimo A. lo spessore dei bastoncini è generalmente superiore ad un micron e nei filamenti si possono mettere sempre in evidenza i bastoncini facendo uso del balsamo di Canada, mentre lo scrivente ha trovato che lo spessore dei bastoncini è generalmente inferiore ad un micron e, nella maggior parte dei filamenti, non si possono distinguere i singoli segmenti.

Circa la metà dei ceppi esaminati presentava i granuli metacromatici o di volutina. Si è potuto constatare la presenza di questi anche dopo due anni di trapianti.

La produzione di acidità dai glucidi e dagli alcoli. — Da quanto è stato esposto in precedenza, risulta che la capacità di produrre gli acidi a

(1) Orla Jensen : *loco cit.*

spese dei glucidi ed alcoli, dovrebbe avere, per i bastoncini lattici, il valore decisivo nella determinazione della specie. Infatti l'Orla Jensen si appoggia in alcuni casi esclusivamente sui suddetti caratteri per stabilire le specie del *Thermobacterium*. A tale proposito afferma che bisogna seguire una tecnica ben determinata, perché altrimenti si corre il rischio di non poter mettere sempre in rilievo le capacità fermentative dei microbi verso determinate sostanze. Ciò riguarda in particolare modo i composti usati come fonte di azoto, non tanto per i composti stessi, quanto per i fattori di accrescimento che li accompagnano; inoltre la capacità fermentativa dovrebbe essere espressa determinando quantitativamente l'acidità prodotta.

Mentre il suddetto A. (1) muove serie e fondate obiezioni riguardanti l'uso del tornasole come indicatore, non fa alcuna critica al bleu di bromotimolo, bromocreo solporpora ed al verde di bromocreo solo, all'infuori dalla constatazione che, per determinare quantitativamente la produzione di acidità, bisogna ricorrere alla titolazione.

L'Orla Jensen, nell'attribuire ad un dato microrganismo la capacità di fermentare un determinato glucide od alcol, si basa sostanzialmente sulla quantità di acidità prodotta dal microrganismo in esame.

A questo procedimento si possono muovere serie obiezioni per infirmare il valore diagnostico della capacità fermentativa agli effetti della determinazione della specie; ciò principalmente per il fatto che alcuni bastoncini del genere *Thermobacterium* possono, in determinate circostanze, produrre quantità variabili di acido lattico a spese di determinati zuccheri ed, in alcuni casi, sino a perderne la capacità per poi acquistarla nuovamente. Particolarmente sono istruttive in merito le esperienze di Winnege e Henneberg riguardanti il comportamento di alcuni termobatteri verso il maltosio, (vedi pag. 13), esperienze con le quali è stato messo in evidenza come, alcuni ceppi classificati come *Tbm. bulgaricum*, acquistavano la capacità di fermentare più o meno fortemente il maltosio se coltivati, per un determinato periodo di tempo, nel latte tale e quale oppure aggiunto dello zucchero in parola.

Tenendo presente quanto sopra, si rimane perplessi quando, dopo aver constatato per es. che un bastoncino classificato da Orla Jensen come *Tbm. jugurt* (1) ha prodotto 0,9‰ di acidità a spese del maltosio, (che è proprio quello zucchero che, se fermentato o no, rappresenta la differenza sostanziale tra il *Tbm. jugurt* e *Tbm. helveticum*) si legge, nello stesso lavoro di Orla Jensen che il *Tbm. jugurt* non è in grado di acidificare il maltosio, Seguendo rigidamente le indicazioni di Orla Jensen diventerebbe assai ardua la classificazione dei ceppi isolati nel presente lavoro ed in quello di Karnicki e Dörner (2), per i quali l'acidità prodotta a spese del maltosio scende spessissimo sotto il 0,9‰, se si pensa che i ceppi in parola sono stati isolati dai formaggi a pasta cotta, ove risultano numerosi e dei quali

(1) Orla Jensen: nel « L.A.B. Ergänzungsband », 1943, pag. 5 e 6.

(2) Karnicki e Dörner: *loco cit.*

presentano la microflora caratteristica. Sarebbe perciò assai azzardato considerarli come *Tbm. jugurt* o *Tbm. bulgaricum*, germi caratteristici dello jugurt, dai quali si differenziano anche per il fatto che, se coltivati nel latte, non riescono mai a conferire a questo l'aroma caratteristico del suddetto latte fermentato.

Infine bisogna citare i lavori di Burri e Kollmann, i quali, per il forte numero di ceppi studiati, portano al riguardo un contributo di grande importanza. Come è stato esposto a pag. 16, tutti i ceppi isolati dai suddetti A.A. dal formaggio emmental o materiale che concorre alla sua fabbricazione (si tratta di qualche centinaio di ceppi studiati), acidificavano costantemente solo destrosio, mannosio, galattosio e lattosio, mentre il maltosio ed il saccarosio, cioè i glucidi sui quali si basa sostanzialmente la differenza tra il *Tbm. lactis* e il *Tbm. helveticum*, venivano spessissimo incostantemente fermentati.

Per ciò che riguarda i ceppi studiati nel presente lavoro, pur non arrivando l'acidità da essi prodotta, a spese dei glucidi, alle cifre riscontrate da Orla Jensen, si nota generalmente, salvo pochi casi, che l'acidità prodotta a spese del levulosio, glucosio, mannosio e galattosio, risultava notevolmente più alta che non quando si trattava degli altri glucidi e alcoli, compresi ivi saccarosio e maltosio. Se si volesse perciò attenersi rigidamente a quanto venne esposto da Orla Jensen solo pochi ceppi, ad esempio n. 41 e n. 42, potrebbero essere considerati capaci di fermentare il maltosio ed il saccarosio; quale valore abbia ciò agli effetti della classificazione, è stato messo in evidenza nel cap. 5.

A tutto ciò bisogna aggiungere, assieme a Burri e Kollmann, che la determinazione della capacità di acidificare i glucidi ed alcoli non è certamente da considerarsi tra i mezzi semplici di identificazione. Considerato perciò che la suddetta proprietà non può essere presa senz'altro in considerazione, date le critiche mosse in merito, nè agli effetti di una classificazione che si ispira a criteri rigidamente scientifici, nè agli effetti di una classificazione che possa dare delle indicazioni di carattere pratico o applicativo, come per esempio la partecipazione dei singoli ceppi alla maturazione del formaggio e la loro utilizzazione nella preparazione delle culture da usarsi nella fabbricazione degli stessi, si domanda se vale la pena, salvo in casi particolari, di ricorrere alla ricerca in parola.

Il potere proteolitico. — I risultati delle presenti ricerche riguardanti la capacità di solubilizzare le sostanze proteiche da parte dei termobatteri, presenti nel siero-fermento e nel formaggio grana, concordano con quanto è stato trovato dagli altri A.A. per i bastoncini appartenenti allo stesso genere (vedi pag. 16). La capacità di solubilizzare la caseina, in un ambiente avente il pH pressochè uguale a quello del formaggio grana fresco, da parte dei termobatteri, che quasi sempre rappresentano, in sostanza, tutta la microflora del formaggio, assume un'importanza del tutto particolare. Infatti, permette di affermare, parallelamente con quanto viene oggi universalmente constatato per gli altri formaggi a pasta cotta, che la maturazione del grana si deve attribuire principalmente ai bastoncini lattici del genere *Thermobacterium* ed agli enzimi da essi prodotti.

CONCLUSIONI

- 1) Dall'esame di numerosi campioni del siero-fermento del formaggio grana è risultato che la microflora dello stesso è rappresentata, quasi sempre, sostanzialmente da bastoncini lattici del genere *Thermobacterium* Orla Jensen. Le forti quantità di siero-fermento che si usano aggiungere al latte in caldaia e le pratiche tecnologiche della fabbricazione del grana, fanno prendere ai suddetti batteri un'assoluta predominanza nel formaggio. Tenendo presente questo fatto sono state isolate, da una diecina circa di campioni del siero-fermento, parecchie decine di ceppi dei bastoncini lattici appartenenti al genere suindicato, allo scopo di studiarne i caratteri morfologici e fisiologici.
- 2) E' stato constatato che, dal punto di vista morfologico, i bastoncini del genere *Thermobacterium* presentano un gruppo notevolmente omogeneo e non differiscono sostanzialmente dai termobatteri descritti da Orla Jensen ed altri A.A.

L'aspetto delle forme microbiche varia notevolmente con il variare del terreno nutritivo e talvolta anche con la anaerobiosi; quest'ultima si dimostra decisamente favorevole allo sviluppo delle colonie che si presentano più spesse ed in genere, anche più grosse.

- 3) Anche gli altri caratteri non presentano sostanziali differenze da quelli descritti da Orla Jensen ed altri A.A. per il genere *Thermobacterium*.

I bastoncini isolati non risultano sporigeni, non producono la catalasi, non riducono i nitrati in nitriti e producono, a spese dei glucidi ed alcoli, acido lattico e solo tracce di altre sostanze.

- 4) Per ciò che riguarda invece i caratteri delle singole specie descritte da Orla Jensen i risultati ottenuti nel presente lavoro dimostrano come alcune proprietà considerate dall'A. summenzionato come basilari per la classificazione, non possono essere prese sempre in considerazione nel senso da lui indicato.

Si tratta dell'acidificazione di alcuni glucidi ed in particolar modo del maltosio e glucosio. Il criterio qualitativo ed ancor più quantitativo sul quale si basa l'Orla Jensen nei riguardi della distinzione tra il *Tbm. lactis*, *Tbm. helveticum*, *Tbm. bulgaricum* e *Tbm. jugurt* non può essere preso in considerazione per i bastoncini isolati e descritti nel presente lavoro.

Infatti solo pochi ceppi potrebbero essere classificati come specie indicate da Orla Jensen, mentre nella maggior parte dovrebbero essere considerati come tipi intermedi o specie a sè stanti.

Assai più razionali e più semplici si sono dimostrate, agli effetti della classificazione, le indicazioni di Burri e Kollmann.

- 5) E' stato infine dimostrato, per la prima volta, che i bastoncini del genere *Thermobacterium* presenti nel siero-fermento del grana e nel grana stesso sono in grado di solubilizzare la caseina pressochè nelle stesse proporzioni e nelle stesse condizioni dei termobatteri descritti da altri A.A., termobatteri considerati quali componenti essenziali della microflora dei formaggi a pasta cotta. Il che permette di concludere che anche la maturazione del formaggio grana è dovuta sostanzialmente ai sopra-indicati bastoncini ed agli enzimi da essi secreti.

SUMMARY

This is the first part of a study undertaken by the A. on the bacterial content of the « grana » cheese (parmesan) which is considered the most important and characteristic of all classic Italian cheeses. In the manufacture of grana, today the so-called « siero fermento » (whey-ferment) used which is but the sour whey so manipulated as to obtain an almost pure culture of lactic acid bacteria, that reaches an average acidity of 1,1-1,3 % expressed in lactic acid.

The bacteria of a good « siero fermento » is generally represented almost exclusively by the genus *Thermobacterium* Orla Jensen, the number of which almost always overreaches the milliard a cc.

Therefore the A. thought that it was fitting to study the thermobacteria of the « siero fermento » in detail, following the methods indicated by Orla Jensen and by Burri and Kollmann.

From the results of these researches the difficulty and sometimes the impossibility of classifying single strains among the species described by Orla Jensen appears inasmuch as every one of them presents characters that are common to two or more of them.

Besides the A. puts in evidence that the power of splitting up casein of thermobacteria is such a one that they may be considered as being the main factors of the maturation of grana cheese.

(Pervenuto in redazione il 5-2-47).

Contributo alla conoscenza dei lieviti di alcuni formaggi

Prof. Tommaso Castelli

Il ruolo che i blastomiceti esercitano nel processo di maturazione dei formaggi è ancora malsicuro e variamente interpretato.

Logicamente l'attività che detti microrganismi possono esercitare è diversa e variabile con i procedimenti tecnici che si mettono in opera per l'ottenimento dei singoli tipi di formaggio. Si ritiene, generalmente, che nei formaggi a pasta dura e cotta e a lungo periodo di stagionatura l'attività dei lieviti sia del tutto insignificante. Molti autori invece, pur riconoscendo che l'attività dei lieviti si espliciti maggiormente nei formaggi molli, ritengono che non si possa escludere un utile intervento di detti microbi anche nell'ottenimento dei formaggi a pasta cotta ed a lungo periodo di stagionatura. E' stato, particolarmente, il Korolev (1) sostenitore della attività utile dei lieviti nei prodotti di trasformazione del latte (burro e formaggi).

Che i lieviti si riscontrino nel latte e che pertanto passino nel burro e nel formaggio è un fatto noto, ma quale sia in realtà l'attività che detti microrganismi esplicano nell'ottenimento delle caratteristiche del burro e dei vari tipi di formaggio è, secondo il mio modesto parere, un argomento sul quale gli uomini di laboratorio debbono ancora utilmente indagare. Conosciamo benissimo quale sia il ruolo dei lieviti per l'ottenimento delle varie bevande fermentate del latte e sappiamo anche che fermenti lattici e fermenti alcolici possono sviluppare benissimo in simbiosi. La mia, ormai lunga, pratica di laboratorio mi permette di affermare che sia lo sviluppo come la vitalità dei fermenti lattici (lattobacilli e streptococchi) e dei fermenti alcolici vengono ad essere esaltati allorchè, in adatti terreni di cultura ed a convenienti temperature, i microrganismi vengono coltivati mescolati anzichè isolati. Quali siano poi le intime ragioni che favoriscono sia lo sviluppo come la sopravvivenza, non è certamente una questione molto semplice a spiegarsi anche perchè non completamente chiarita ed in ogni modo essa esula dallo scopo del presente lavoro.

Potendo avere a disposizione in maniera costante vari tipi di formaggio prodotti nell'alta valle del Tevere ed ottenuti sia da solo latte di pecora, come da solo latte di vacca o dalla mescolanza dei due, ho creduto opportuno sottoporli ad un'indagine sia a riguardo delle specie di blastomiceti che in essi si riscontravano come del loro quantitativo.

Prima di riferire le indagini eseguite credo necessario riassumere le conoscenze rese note negli ultimi anni e riguardanti particolarmente le indagini eseguite su prodotti italiani. Nel 1932-33 sono apparsi due pregevoli lavori di Sacchetti (2) (3). Questo autore ha preso in considerazione dei formaggi molli sia preparati nel bolognese come uno stracchino lombardo. Nei due lavori vengono descritti diversi blastomiceti sia sporigeni come del tutto incapaci a produrre spore isolati da tali formaggi; oltre allo studio di identificazione vengono forniti i risultati ottenuti da alcuni saggi e vengono riferiti i referti ottenuti dall'immissione di diverse forme di blastomiceti in un formaggio stracchino. Nelle note di Sacchetti, pur non essendo state eseguite conte, si afferma che il contenuto in lieviti dei formaggi considerati era elevatissimo ed in ogni modo superiore a quello dei batteri e degli eumiceti.

Luchetti e Nanni (4) descrivono due nuove specie di lieviti isolati dal formaggio « Bel Paese », e Luchetti (5) in un contributo allo studio della flora blastomicetica di formaggi pecorini, riferisce le indagini eseguite su sette campioni di formaggio di latte di pecora di diversa provenienza. Luchetti, dopo aver rapidamente accennato alla tecnica seguita, descrive diversi ceppi da riportarsi a *Monilia*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Torulopsis*. Traetta, Mosca e Navone (6) descrivono tre forme di saccaromiceti isolati dal formaggio pecorino romano. Dalla Torre (7) ha messo in evidenza nel formaggio « Bel Paese » quantità notevoli di blastomiceti. I lieviti raggiungevano cifre di oltre 120 milioni per grammo di crosta a semimaturità mentre nella parte interna ed a completa maturità il numero scendeva a tre milioni per grammo di materiale. Anche dalle indagini di vecchi ricercatori Esten e Mason (8), Eduard (9), Beijerinck (10) risulta che molto spesso sono stati, dai formaggi, messi in evidenza lieviti ma che, sia sul loro numero come sulla reale attività, i criteri erano molto discordi.

I risultati ottenuti dalle mie indagini si distaccano notevolmente da quelli ottenuti da altri ricercatori e ciò spiega il perchè della presente nota. Darò, per sommi capi, la tecnica seguita nelle ricerche. Come ho già detto l'indagine, che si può considerare come orientativa, è stata rivolta sia a prodotti ottenuti da solo latte di pecora o da solo latte di vacca o dalla mescolanza dei due latti, ed eseguita in vari momenti della maturazione dei formaggi. Furono eseguiti isolamenti facendo culture per disseminazione su gelatina al mosto d'uva come conte culturali valendosi del medesimo substrato. In ogni caso il materiale posto in analisi è stato prelevato nella parte interna della forma. Il prelevamento del campione da sottoporre all'analisi è stato ottenuto nella seguente maniera. Mediante una trivella da formaggio sterilizzata venivano presi dalla parte interna del formaggio diversi campioni di pasta che venivano accuratamente mescolati in un mortaio sterilizzato. Si pesavano poi, sempre operando in asepsi, due grammi della poltiglia che venivano successivamente disgregati, in un mortaio sterilizzato, con acqua sterile fino ad ottenere una sospensione finissima. Sempre con acqua sterile si riprendeva il tutto, si lavava il mortaio e si riportava a volume di 100 cc. m una bottiglietta a tappo smerigliato della capacità di 200 cc.

Da questa sospensione, opportunamente agitata, veniva prelevato il materiale sia per le culture di isolamento come per l'allestimento delle conte.

Per le conte sono state messe in opera le seguenti modalità: in tre piastre Petri di 9 cm. di diametro si portavano rispettivamente 1/2- 1/10- 1/20 di cc. della sospensione e successivamente si versava nelle piastre, agitando opportunamente, la gelatina di mosto. Dal numero di colonie blastomicetiche sviluppate, in un periodo di osservazione di 15 giorni alla temperatura di 18°, si risaliva al contenuto di blastomiceti per grammo di formaggio.

Nella sottostante tabellina sono riassunti i risultati ottenuti; in una prima colonna di essa è riportato il numero di riferimento del campione esaminato, in una seconda i dati relativi alla qualità del formaggio e al periodo di stagionatura, mentre nella terza colonna sono indicate le cifre di blastomiceti riscontrati per grammo di materiale. Debbo fin da ora accennare che lo sviluppo ottenuto nelle piastre mostrava una grande uniformità nei tipi di colonie sviluppate.

Numero di riferimento	Caratteri dei campioni di formaggio					Risultati delle conte
1	formaggio	di solo	latte di	pecora	5 mesi e mezzo	2.000.000
11	id.	id.	id.	id.	4 mesi	1.435.000
10	id.	id.	id.	id.	di circa un mese	425.000
7	id.	id.	id.	id.	12 mesi	5.500
2	formaggio	di solo	latte di	vacca	di circa un mese	2.500.000
5	id.	id.	id.	id.	5 mesi	1.500.000
8	id.	id.	id.	id.	6 mesi	300.000
9	id.	id.	id.	id.	7 mesi	350.000
6	formaggio	di latte	di pecora	e vacca	di circa 25 giorni	3.000.000
3	id.	id.	id.	id.		500.000
4	formaggio	Grana	di oltre	un anno	5 mesi	18.000

La tabellina dimostra che il contenuto in lieviti nei formaggi esaminati non è molto elevato e che il loro numero va decisamente diminuendo con la stagionatura. Ciò si verifica sia per i formaggi ottenuti da solo latte di pecora come da solo latte di vacca o dalla mescolanza dei due. Avendosi a disposizione un formaggio Grana, vecchio di oltre un anno, si è voluto anche su di esso eseguire la medesima indagine e le cifre riscontrate per il Grana sono risultate simili a quelle trovate per gli altri formaggi.

Nelle culture di isolamento per disseminazione su gelatina al mosto d'uva, dopo 8-10 giorni alla temperatura di 18°, si osservava sufficiente sviluppo da permettere un facile isolamento. Come per le indagini eseguite sugli agenti della vinificazione nelle diverse regioni italiane (11) (12) si è avuto di mira di eseguire isolamenti soltanto da quelle colonie che erano in nettissima predominanza, perchè soltanto le forme rappresentate in largo numero sono quelle che possono, eventualmente, esplicare una funzione. E' facile farsi un concetto della predominanza delle colonie sia eseguendo un attento esame macroscopico, eventualmente valendosi anche di osservazioni a piccolo ingrandimento, come facendo una serie di preparati per impressione che, colorati e posti al microscopio, mostrano le forme che co-

stituiscono le singole colonie. Come ho già detto l'aspetto delle singole piastre era generalmente molto uniforme e pertanto a volte è stato eseguito un solo isolamento, ma per lo più due ed a volte tre ed anche quattro.

Sono state, in tal maniera, isolate 25 culture di lievito che sono state sottoposte allo studio di identificazione. La tecnica seguita allo scopo, è quella da tempo messa in uso in laboratorio e che corrisponde, con qualche lieve modifica, a quella seguita ed indicata dagli studiosi olandesi Stelling-Dekker (13), Lodder (14), Lodder e Diddens (15). Ne darò pertanto un rapido cenno.

La forma e le dimensioni delle cellule sono state stabilite in culture in mosto d'uva ed agar di malto rispettivamente di 24 ore e tre giorni a 25°. La fusione della gelatina è stata ricercata su infissioni in gelatina di mosto e su colonie giganti allestite sul medesimo substrato, mantenute in osservazione per circa due mesi alla temperatura di 18°.

La ricerca della capacità a sporificare è stata eseguita su agar di malto, agar Gorodkova ed eventualmente sul gesso e sulla silice. La fermentescibilità degli zuccheri è stata ricercata su brodo di carne con l'aggiunta del 2% dello zucchero, posto in provette Durham. Il potere fermentativo è stato misurato ricercando la quantità di alcol prodotto, per distillazione, seminando i singoli ceppi in mosto sterile al 30% di zucchero ed eseguendo l'analisi dopo trenta giorni di permanenza in ambiente a 18°. Per l'assimilazione dell'alcol etilico, quale unico alimento idrocarbonato, come per il saggio di assimilazione dei nitrati, mi sono attenuto alle modalità indicate dalla Stelling Dekker.

Ritengo più dimostrativo esprimere i risultati dei diversi saggi eseguiti riunendoli nella seguente tabella riassuntiva ove in tante colonne sono riunite le osservazioni eseguite, mentre un'apposita leggenda servirà a chiarire le diverse indicazioni.

Campione di formaggio	Stipite	1	2	3	4	5	6	Saggio della sporificazione	Fermentazione					Potere fermentativo	Diagnosi
		Colonia su ge- latina su mosto	Aspetto cultura su mosto	Esame microsc. su mosto	Aspetto cultura su agar malto	Esame microsc. su agar malto	Infissione su ge- latina di mosto		Glucosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio		
I	1	A	A	A	B	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces Klöckeri
	2	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	3	E	B	B	C	B	B	partenogenesi 1-2-3-4 spore	+	+	+	+	—	13,22	Saccharomyces ellipsoideus
	4	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
II	5	C	B	B	A	B	B	isogamia 1-4 spore	+	+	+	—	+	4,95	Zygosaccharomyces lactis
	6	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	7	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
III	8	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	9	B	C	C	D	D	C	—	—	—	—	—	—	—	Rhodotorula longissima
IV	10	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola

II	A	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
V	12	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	13	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VI	14	C	B	B	A	B	B	isogamia 1-4 spore	+	+	+	+	Zygosaccharomyces lactis
VII	15	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VIII	16	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	17	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	18	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	—	—	Zygosaccharomyces Barkeri
IX	19	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	—	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	20	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
X	21	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	22	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	23	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
XI	24	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	—	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	25	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola

LEGGENDA

1 = Aspetto delle colonie su gelatina di mosto dopo 8 giorni a 18°.

- A = colonia gibbosa, di colore bianco latteo, opaca, distaccantesi integralmente dal substrato.
- B = colonia cremosa di colore rosa corallo.
- C = colonia di colore grigiastro a margini dentati.
- D = colonia di colore bianco, mucosa.
- E = colonia sopraelevata, a cornetto, di colore bianco giallognolo.

2 = Aspetto della cultura su mosto dopo 15 giorni a 25°

- A = mosto torbido, deposito, velo liscio risaliente di colore bianco.
- B = fermentazione attiva, deposito.
- C = intorbidamento, deposito e traccia di velo rossiccio.

3 = Aspetto microscopico della cultura in mosto d'uva dopo 24 ore a 25°.

- A = cellule di forma globosa con globulo centrale, isolate o riunite a gruppi di pochi elementi, dimensioni μ 3-4 x 3-5.
- B = cellule ovalari o ellittiche, isolate o a piccoli gruppi, delle dimensioni di μ 5-7 x 8-12.
- C = cellule per lo più a forma di salsiccia, dimensioni μ 4-5 x 8-15.

4 = Aspetto delle culture su agar di malto dopo 30 giorni a 25°.

- A = patina biancastra di aspetto asciutto.
- B = patina mucosa di colore tendente al giallastro.
- C = patina liscia di colore bianco.
- D = patina di colore rosa aranciato, splendente, mucosa, liscia a margini interi.

5 = Esame microscopico su agar di malto dopo 3 giorni a 25°

- A = cellule globose isolate o a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 3,5-5.
- B = cellule ovalari isolate o a gruppetti di μ 6-8 x 10-12.
- C = cellule globose o leggermente ovalari, isolate o riunite a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 2,5-3 x 5-6.
- D = cellule a forma di salsiccia di μ 8 x 12-14.

6 = Aspetto dell'infissione su gelatina di mosto dopo 30 giorni a 18°

- A = sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, espansa, patina di colore bianco latteo, assenza di liquefazione.
- B = sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, mucosa, e forte fessuramento della gelatina per produzione di gas, assenza di liquefazione.
- C = sviluppo quasi esclusivamente in superficie di patina di colore rosa.

Le indicazioni + e - relative ai saggi di fermentazione, stanno ad indicare: fermenta e non fermenta.

II	A	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
V	12	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	13	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VI	14	C	B	B	A	B	B	isogamia 1-4 spore	+	+	+	+	Zygosaccharomyces lactis
VII	15	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	16	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VIII	17	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	18	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	+	—	Zygosaccharomyces Barkeri
IX	19	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	+	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	20	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
X	21	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	22	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	23	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
XI	24	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	+	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	25	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola

LEGGENDA

- 1 = Aspetto delle colonie su gelatina di mosto dopo 8 giorni a 18°.
- A= colonia gibbosa, di colore bianco latteo, opaca, distaccantesi integralmente dal substrato.
 - B= colonia cremosa di colore rosa corallo.
 - C= colonia di colore grigiastro a margini dentati.
 - D= colonia di colore bianco, mucosa.
 - E= colonia sopraelevata, a cornetto, di colore bianco giallognolo.
- 2 = Aspetto della cultura su mosto dopo 15 giorni a 25°.
- A= mosto torbido, deposito, velo liscio risalente di colore bianco.
 - B= fermentazione attiva, deposito.
 - C= intorbidamento, deposito e traccia di velo rossiccio.
- 3 = Aspetto microscopico della cultura in mosto d'uva dopo 24 ore a 25°.
- A= cellule di forma globosa con globulo centrale, isolate o riunite a gruppi di pochi elementi, dimensioni μ 3-4 x 3-5.
 - B= cellule ovalari o ellittiche, isolate o a piccoli gruppi, delle dimensioni di μ 5-7 x 8-12.
 - C= cellule per lo più a forma di salsiccia, dimensioni μ 4-5 x 8-15.
- 4 = Aspetto delle culture su agar di malto dopo 30 giorni a 25°
- A= patina biancastra di aspetto asciutto.
 - B= patina mucosa di colore tendente al giallastro.
 - C= patina liscia di colore bianco.
 - D= patina di colore rosa aranciato, splendente, mucosa, liscia a margini interi.
- 5 = Esame microscopico su agar di malto dopo 3 giorni a 25°
- A= cellule globose isolate o a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 3,5-5.
 - B= cellule ovalari isolate o a gruppetti di μ 6-8 x 10-12.
 - C= cellule globose o leggermente ovalari, isolate o riunite a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 2,5-3 x 5-6.
 - D= cellule a forma di salsiccia di μ 8 x 12-14.
- 6 = Aspetto dell'infissione su gelatina di mosto dopo 30 giorni a 18°
- A= sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, espansa, patina di colore bianco latteo, assenza di liquefazione.
 - B= sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, mucosa, e forte fessuramento della gelatina per produzione di gas, assenza di liquefazione.
 - C= sviluppo quasi esclusivamente in superficie di patina di colore rosa.

Le indicazioni + e - relative ai saggi di fermentazione, stanno ad indicare: fermenta e non fermenta.

Nella seguente sottostante tabella sono riportate le specie isolate con le indicazioni relative ad i campioni di formaggio su cui vennero riscontrate e del numero complessivo di stipiti isolati per le diverse specie.

Specie	Formaggi in cui la specie venne riscontrata	Numero degli stipiti isolati
<i>Debaryomyces tirocola</i>	1-2-3-4-5-7-8-9-10-11	17
<i>Zygosaccharomyces lactis</i>	2-6	2
<i>Zygosaccharomyces Barkeri</i>	9-11	3
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	1	1
<i>Debaryomyces Klöckeri</i>	1	1
<i>Rhodotorula longissima</i>	3	1

L'esame della tabella dimostra in maniera evidente che il genere di blastomiceti predominante è il genere *Debaryomyces* e la specie che, quasi costantemente si riscontra, è quella descritta da Konokotine come *Debaryomyces tirocola*. Appartenente al genere *Debaryomyces*, ma riscontrata in un solo campione di formaggio, è la specie *Deb. Klöckeri*. In quattro campioni di formaggi o sono state isolate delle forme da riportarsi al genere *Zygosaccharomyces*, l'identificazione delle quali ha dimostrato trattarsi dello *Zygosaccharomyces Barkeri* e *Zygosaccharomyces lactis*. Del tutto casuale si deve intendere l'isolamento del *Saccharomyces ellipsoideus* e della *Rhodotorula longissima* in un solo campione di formaggi.

Lo studio di identificazione ha mostrato qualche difficoltà a riguardo del *Deb. tirocola* poiché i numerosi stipiti isolati presentavano delle differenze, sia pur lievi ma costanti, a riguardo degli aggruppamenti cellulari come, maggiormente, delle dimensioni delle cellule. Le mie osservazioni confermano quindi quelle di Konokotine (16) che, del *Debaryomyces tirocola*, ne distinte quattro varietà e precisamente α , β , γ , δ . Nella monografia della Stelling Dekker le varietà del *Debaryomyces tirocola* distinte dal Konokotine sono indicate come stipite 1, 2, 3. Le culture da me isolate sono da riportare, principalmente allo stipite 2, cui seguono quelle da ritenersi identiche allo stipite I ed ultime, numericamente, quelle riferibili allo stipite 3. Il lavoro da me eseguito conferma quindi le indagini di Konokotine il quale isolò il *Deb. tirocola* appunto dal formaggio.

Mi sembra quindi lecito affermare che nei formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere i lieviti che si riscontrano si debbono, più che altro, riportare al genere *Debaryomyces* e particolarmente alla specie *tirocola*.

Anche nelle ricerche eseguite sull'unico campione di formaggio Grana, è stato trovato il *Deb. tirocola*, anzi nell'analisi del detto formaggio l'uniformità delle colonie sviluppate sulle piastre era tale che si ritenne opportuno eseguire un solo isolamento.

Per quale ragione nei formaggi da me esaminati sono stati riscontrati i *Debaryomyces* che nessuno degli autori italiani ha messo in evidenza

nei formaggi prodotti in Italia? I risultati da me messi in evidenza valgono soltanto per i formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere? Oppure bisogna pensare che i formaggi sono stati da me esaminati quando le altre specie di lievito erano rappresentate in numero scarsissimo? Che la diversità del risultato da me ottenuto sia da imputarsi al substrato di cultura è assolutamente da escludere perchè la gelatina al mosto d'uva è un terreno che risponde benissimo per l'isolamento dei lieviti e si può dire, anzi, che soltanto i *Debaryomyces* vi producono uno sviluppo piuttosto scarso, perchè, com'è noto, questi lieviti crescono rigogliosissimi sui terreni ricchi di proteine. E' quindi indubbio che nei formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere i lieviti che predominano sono da riportare alla specie *Deb. tirocola*. Verranno al più presto condotte indagini sugli stessi formaggi, ma di preparazione recentissima, di pochi giorni e di poche settimane, allo scopo di confermare o meno i risultati ottenuti.

Le ricerche eseguite hanno dimostrato che il contenuto in lieviti non è molto elevato e che esso diminuisce decisamente col progredire della stagionatura. Qual'è la funzione che i *Debaryomyces* esplicano nella maturazione del formaggio? Com'è noto i lieviti da riportarsi al genere *Debaryomyces* si riscontrano generalmente nella carne. Cesari (17), Cesari e Guilliermond (18) Mrak e Bonar (19), Mrak e Bonar (20), Castelli e Sisani (21) ed infine Giovannozzi (22) li ha riscontrati in gran numero nella fermentazione dei tabacchi pesanti italiani.

Le cifre di *Debaryomyces* riscontrate non sono apparse molto elevate ma a questo riguardo necessita ricordare che le prime conte sono state eseguite circa un mese dopo la preparazione dei formaggi. Sarebbe stato pertanto molto utile eseguire le medesime indagini anche su prodotti molto freschi, ma come è stato già accennato, dette ricerche verranno condotte al più presto. Qualora le quantità di *Debaryomyces* riscontrate fossero state notevolmente più elevate quali modificazioni avrebbero potuto portare nei formaggi in considerazione? Onde dare una qualche risposta ad i vari interrogativi è stato eseguito qualche saggio, che va inteso in senso semplicemente orientativo, e precisamente uno stesso latte misto di pecora e vacca è stato diviso in due porzioni una delle quali è stata caseificata col procedimento normalmente in uso, mentre all'altra è stata aggiunta una certa quantità di lievito in pasta umido, ottenuto raccogliendo patine di *Debaryomyces tirocola* sviluppate su agar di malto per cinque giorni a 25°.

I formaggi ottenuti vennero poi mantenuti nelle stesse condizioni e subirono le identiche manipolazioni. I saggi eseguiti su detti formaggi sono stati, più che altro, di indole organolettica ma sono state eseguite anche conte di blastomiceti mettendo in opera la tecnica già descritta. Per ciò che riguarda i caratteri organolettici le differenze sono apparse molto scarse e particolarmente nei primi due mesi esse erano del tutto trascurabili. Nel prosieguo della maturazione i formaggi ottenuti con immissione di lievito si presentavano più dolci, meno sapidi, ma di gusto certamente più delicato, a riguardo della tessitura interna però essi si presentavano meno uniformi ed anche all'aspetto esterno le forme si mostravano leggermente rigonfie.

I risultati ottenuti dalle conte si possono così riassumere: nell'analisi dei prodotti freschissimi, come dei primi due mesi, le cifre riscontrate nei formaggi ottenuti con immissione di culture di Deb. tirocola erano molto elevate (15-20 milioni di grammo di materiale) e molto superiori a quelle messe in evidenza nei formaggi ottenuti in maniera normale. Dopo il quarto mese però, le conte sono state eseguite fino al sesto mese, le cifre riscontrate si potevano considerare identiche.

Non è facile dare una spiegazione del tardivo, sia pur leggero, rigonfiamento osservato nei formaggi ottenuti con l'aggiunta di Deb. tirocola. Sia per l'incapacità del detto germe a fermentare gli zuccheri come perchè il leggero rigonfiamento appare oltre il secondo mese della preparazione, è da escludersi che il gas provenga dall'attacco del lattosio. Tutto fa pensare che la produzione di gas derivi dall'attacco di altri costituenti e più che altro dalla degradazione della caseina!

Se l'aspetto esteriore dei formaggi ottenuti in maniera normale era migliore di quello che si osservava nei prodotti con aggiunta di Deb. tirocola, è stato detto che questi ultimi si presentavano più dolci e di gusto certamente più delicato. Riuscirà quindi di una certa utilità agire ancora sull'argomento eseguendo un maggior numero di indagini microbiologiche e correderle di analisi chimiche. Detto lavoro verrà iniziato al più presto.

RIASSUNTO

Vengono riferite indagini microbiologiche a riguardo delle forme e della quantità di lieviti presenti in formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere e preparati sia con latte di pecora, come di vacca o dalla mescolanza dei due. Il genere di blastomiceti predominante è il genere *Debaryomyces* Klocker e la specie, quasi costantemente presente, il *Deb. tirocola* Konokotina.

SUMMARY

The author relates about investigations concerning types and quantities of yeasts existent in the cheeses which are produced in the high Tiber valley and prepared through sheep's milk or cow's milk or through a mixture of both of them.

The genus of yeasts, which is prevailing, is the genus *Debaryomyces* and the species, which is nearly always present, is the *Deb. tirocola* Konokotina.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Korolev: citato da Sacchetti (vedi n. 3).
- (2) Sacchetti: « Archiv für Mikrobiologie », 3 Band, 5 Heft., 1932.
- (3) Sacchetti: « Archiv für Mikrobiologie », 4 Band, 3 Heft., 1933.
- (4) Luchetti e Nanni: « Nuovi Annali dell'Agricoltura », XV, 1935.
- (5) Luchetti: « Atti Soc. Toscana Scienze Naturali », vol. 46, n. 3, 1936.
- (6) Traetta, Mosca e Navone: « An. Chim. Appl. », vol. 7, 1923.

- (7) Dalla Torre: « Ann. Ist. Sper. Caseif. Lodi », vol. 4, 1929.
- (8) Esten e Mason: « Agric. Exp. Stat. Pensilvania Bull. », 15, 1883.
- (9) Eduard: « Science », 1913.
- (10) Beijerinck: « Bot. Zeitung », 1891.
- (11) De' Rossi: *Rel. IV Congr. Int. della Vigna e del Vino* - Lausanne, 1935
- (12) Castelli: « Nuovi Annali dell'Agricoltura », 1939.
- (13) Stelling-Dekker: *Die Sporogenen Hefen. Uigave Van de Koninklijke Akad. van Vetenschapen.* - Amsterdam, 1931.
- (14) Lodder: *Die Anaskosporogenen Hefen (Erste Halfte)* - N. V. Noord-Hollandsche Huitgevrsmatchappij, Amsterdam, 1934.
- (15) Lodder e Diddens: *Die Anaskosporogenen Hefen (Zweite Halfte).* - N. V. Noord-Hollandsche Huitgevrsmatchappij, Amsterdam, 1942.
- (16) Konokotine: « Bull. Jardin Bot. St. Petersburg », vol. 13, 1913.
- (17) Cesari: « Compt. Ren. Akad. des Sc. », vol. 168.
- (18) Cesari e Guilliermond: « Ann. Inst. Pasteur », vol. 34, 1930.
- (19) Mrak e Bonar: « Food Research. », vol. 3, 1938.
- (20) Mrak e Bonar: « Cent. f. Bakt. », 2 Abt., Band. 100, 1939.
- (21) Castelli e Sisani: Ricerche di prossima pubblicazione.
- (22) Giovanozzi: « Boll. Tecnico Scafati », 3-4, 1941.

(Pervenuto in redazione il 18-2-47)

Ricerche sul metabolismo glucidico dei lieviti

I. Politi - C. Colla - R. Benetti

Gli studi sulle attività fisiologiche dei lieviti hanno seguito essenzialmente due indirizzi: uno di carattere eminentemente pratico, l'altro di carattere più propriamente chimico; il primo cioè diretto alla precisazione delle condizioni più favorevoli o più vantaggiose allo svolgersi dei processi fermentativi e moltiplicativi, che stanno alla base delle industrie dell'alcool e dei lieviti per panificazione o per uso alimentare; il secondo, invece, diretto a chiarire l'intimo chimismo delle reazioni metaboliche.

Di notevole interesse a questo riguardo sono anche le ricerche e gli studi relativi alla nota reazione di Pasteur (soppressione del metabolismo glucidico anaerobico da parte della respirazione), il cui meccanismo è stato ben lumeggiato dalle classiche esperienze di Meyerhof e, più di recente, anche dai contributi sperimentali di Trautwein e Weigand (1), Kluyver e Hoogerheide (2).

Le attività respiratorie e fermentative dei lieviti presentano tuttavia diversi lati oscuri; e molti fenomeni ci appaiono del tutto inspiegabili, se non tenendo presente che essi si svolgono ad opera di un organismo vivente, il quale è sede di tutto un complesso di reazioni chimiche e chimico-fisiche concatenate e largamente influenzate da numerosi fattori ambientali. Si deve anche ricordare, in proposito, che è caratteristica tipica e comune a tutte le cellule microbiche quella di un adattamento alle condizioni del mezzo, adattamento che, non soltanto si manifesta in modo attuale (intensità e deviazioni delle singole reazioni metaboliche), ma comporta altresì delle modificazioni più o meno notevoli, e non sempre del tutto reversibili (dissociazioni), della stessa costituzione enzimatica del protoplasma.

Ricerche compiute nel nostro Istituto (3) avevano ad esempio posto in luce che la proprietà di utilizzare lo xilosio non è un carattere posseduto dalle cellule di *Torulopsis utilis* cresciute in presenza di glucosio, bensì un carattere acquisito in seguito ad un adattamento che molto facilmente sfugge all'osservazione, in quanto si compie prontamente, con un semplice trapianto, quando il substrato contiene come energetico solo xilosio.

(1) K. Trautwein e K. Weigand, *Biochem. Zeitschr.*, t. 240, 1931, pag. 423.

(2) A. J. Kluyver et J. C. Hoogerheide, *Proc. Kon Acad. v. Wet. Amsterdam*, t. 36, 1933, pag. 605. - J. C. Hoogerheide, *Ann. Ferment.* I, 1935-36, pag. 385.

(3) C. Arnaudi, I. Politi e C. Colla, *Ricerche sulla produzione di lievito dai liscivi bisolfidici dell'industria della cellulosa* da « La Chimica e l'Industria ». Maggio-giugno, 1944, pag. 67.

D'altra parte uno di noi aveva già avuto occasione di constatare che lieviti della specie *ellipsoideus*, i quali - come è noto - sono del tutto inattivi sui pentosi, erano praticamente incapaci o per lo meno stentavano a portare a termine la fermentazione alcoolica del glucosio in liquidi contenenti dello xilosio.

La inspiegabilità di questo fenomeno ci ha indotti ad approfondire le ricerche sul metabolismo idrocarbonato dei lieviti, movendo appunto dalla intravista influenza che uno zucchero non utilizzato come lo xilosio, può esplicare sull'attività fermentativa.

L'indagine venne condotta controllando, mediante la tecnica manometrica di Warburg, l'attività respiratoria e fermentativa di sospensioni di un ceppo di *Saccharomyces ellipsoideus* in presenza di zuccheri diversi, a differenti rapporti di concentrazione. L'indagine medesima ha richiesto anche il controllo del comportamento respiratorio e fermentativo in rapporto alla concentrazione dei singoli zuccheri per valori di questa inferiori all'1%; si sono altresì ripetute le esperienze impiegando sospensioni di lievito ottenute sia da culture su piastre di agar malto, sia da culture aerobiche liquide (brodo malto) e perciò in differente stato fisiologico. Le condizioni e i risultati delle singole esperienze sono riassunti nelle tabelle e nei grafici annessi.

INFLUENZA DELLA CONCENTRAZIONE ZUCCHERINA

Come si rileva dai dati delle tabelle I, II, III, e dai diagrammi 1 e 2 si è constatato che la concentrazione può esplicare un'influenza molto variabile, a seconda della natura dello zucchero cimentato e di altre condizioni. Infatti per concentrazioni di glucosio comprese fra 1% e 0,1%, la respirazione risultò pressochè costante con una sospensione di lievito, ottenuta da una cultura di 24 ore su agar malto (tab. I); invece in una esperienza con lievito ottenuto da una cultura in bordo malto (tab. II, diagr. I), si ottennero intensità respiratorie fortemente influenzate dalla concentrazione del glucosio. Codesta influenza appare consistere in due stimoli opposti, tendenti, con il diminuire della concentrazione, l'uno alla diminuzione, l'altro all'aumento degli scambi respiratori. Passando dall'1% al 0,5% appare manifesto il primo di tali stimoli, mentre passando dal 0,5% al 0,25% prevale il secondo.

Questo singolare comportamento può forse essere spiegato ponendo in relazione i processi respiratori con i fenomeni di cui è sede la cellula microbica allorchè le condizioni di ambiente ne indirizzano l'attività verso il passaggio ad uno stato di vita latente, passaggio che avvenendo dopo l'esaurimento del substrato respiratorio, indubbiamente comporta un complesso di reazioni metaboliche per le quali potrebbe benissimo essere necessario un eccezionale concorso energetico. Questa spiegazione, tuttavia, ha per ora carattere di ipotesi, che solo ulteriori ricerche potranno convalidare od escludere. D'altra parte si osserva che la diversità di comportamento nelle due esperienze può essere attribuita a cause diverse; potrebbe cioè essere in relazione al diverso stato fisiologico del lievito, ottenuto rispettivamente da cultura superficiale su agar malto e da cultura liquida, ma potrebbe, anche

e più verosimilmente, dipendere dalle diverse condizioni in cui si sono controllate le attività respiratorie: in un caso infatti la sospensione microbica conteneva mgr. 4,6 di lievito (espresso come sostanza secca) e nell'altro appena mgr. 0,04. Se quest'ultima spiegazione rispondesse a verità, è chiaro che la concentrazione zuccherina esplicherebbe una sensibile influenza solo in condizione di densità microbica del mezzo sufficientemente bassa, vale a dire di disponibilità di O₂, in seno al substrato, al di sopra di un certo limite (potenziale ossido-riduttivo sufficientemente elevato). La stessa influenza del variabile stato fisiologico del lievito che si è supposta più sopra, in fondo potrebbe manifestarsi appunto in conseguenza delle differenti attività respiratorie di cellule cresciute in condizioni diverse. Pertanto il complesso dei fenomeni osservati potrebbe anche essere interpretato come connesso a particolari influenze di ordine chimico-fisico di cui per ora ci sfugge completamente il meccanismo, ma che non si può escludere possano essere collegate al singolare comportamento dei glucidi studiati da Würmser e Geloso (1).

Nell'unica esperienza istituita per il galattosio, (tab. III, diagr. 2) con una sospensione di lievito, ottenuto da una cultura su agar malto si è pure osservata una spiccata influenza della concentrazione zuccherina. Infatti l'intensità respiratoria decresce con il diminuire della concentrazione; però, considerando l'andamento degli scambi respiratori nel tempo, si osserva che: in presenza di galattosio al 0,75% si ha una leggera diminuzione; al 0,5%, 0,25% e 0,1% si ha invece dapprima una diminuzione più o meno accentuata, e quindi un incremento notevole. Pertanto anche per il galattosio si deduce che l'influenza esplicata dalla concentrazione è piuttosto complessa e verosimilmente congiunta a tutta una serie di reazioni, il cui meccanismo per ora ci sfugge completamente.

INFLUENZA DELLO XILOSIO SULL'ATTIVITÀ RESPIRATORIA E FERMENTATIVA DEL LIEVITO IN PRESENZA DI GLUCOSIO

Le ricerche effettuate hanno dimostrato in primo luogo che la presenza di xilosio, almeno sino alla concentrazione dell'1%, non modifica praticamente la respirazione basale del lievito d'esperienza. Viceversa è emerso che lo xilosio può esplicare una spiccatissima influenza sulle attività ossidative e fermentative che il lievito esplica sul glucosio, nel senso di modificare notevolmente l'intensità.

Anche qui l'indagine ha consentito di constatare che si tratta di una influenza alquanto mutevole, non solo come entità, ma pure come senso: il tutto in relazione al rapporto fra le concentrazioni dei due zuccheri ed allo stato fisiologico del lievito.

L'esperienza di cui la tabella IV e il diagramma 3 riassumono i risultati, dimostra l'influenza dello xilosio all'1%, essendo del 0,5% la concen-

(1) Da R. Würmser, *Oxydations et réductions*. Les presses universitaires de France. Paris, 1930.

trazione del glucosio, su lievito ottenuto da cultura liquida; la presenza dello xilosio ha determinato qui un forte aumento della respirazione e contemporaneamente, conforme alla reazione di Pasteur, una notevole depressione dell'attività fermentativa.

In una successiva esperienza (tab. V), effettuata con lievito cresciuto su agar malto, si controllò l'influenza dello xilosio al 0,25%, 0,5% 0,75% e 1%, in presenza di glucosio all'1%; qui l'influenza è risultata meno netta ma di natura complessa; ciò che si può dedurre da questa esperienza soprattutto mettendola in rapporto con le altre, è che la presenza dello xilosio non è indifferente per lo svolgersi delle attività respiratorie e fermentative del lievito, ma agisce come stimolo, ora in un senso ora nell'altro, come risulta più chiaramente, per le diverse condizioni in cui si è operato, dall'esperienza di cui alla tabella VII.

Nell'esperienza della tabella VI, compiuta ancora con lievito ottenuto da agar coltura, venne controllata l'influenza esplicita sulla respirazione dallo xilosio al 0,5% e 1%, per tre concentrazioni diverse di glucosio (1%, 0,5%, 0,25%). Questa influenza, considerando l'andamento degli scambi respiratori anche nel tempo, appare poco accentuata e con indirizzo mutevole.

Infine in un'ultima esperienza (tab. VII, diagr. 4 a, b, c), compiuta con lievito separato da una coltura di brodo malto, venne controllata la respirazione in presenza di glucosio a tre diverse concentrazioni (1%, 0,5 %, 0,25 %) e di xilosio al 0,5% e 1%. Qui l'intensità respiratoria è apparsa fortemente e variamente influenzata dalla concentrazione di entrambi gli zuccheri: innanzitutto si osserva che, in presenza di solo glucosio, l'intensità della respirazione risultò decrescente dall'1% al 0,5% e quindi crescente dal 0,5% al 0,25%. La presenza dello xilosio ebbe effetto più accentuato all'1% che al 0,5%, però, mentre in presenza di glucosio alla concentrazione dell'1% e 0,25% l'effetto fu deprimente, in presenza di glucosio al 0,5% l'effetto fu esaltante. Si deduce quindi che la presenza di xilosio comporta in realtà due stimoli opposti di cui, a seconda delle condizioni del substrato, prevale l'uno o l'altro, in modo analogo a quanto si verifica già per le basse concentrazioni dello stesso glucosio.

E' da osservare in proposito che l'esperienza qui esposta, a differenza delle precedenti, venne effettuata con una massa microbica molto esigua (mgr. 0,04, come sostanza secca, per vaschetta); e perciò anche qui valgono le stesse considerazioni svolte in merito all'influenza della semplice concentrazione del glucosio; in altri termini anche l'influenza dello xilosio apparirebbe collegata a particolari condizioni ossido-riduttive del substrato; e così pure al variabile stato fisiologico del lievito, per le differenti attività respiratorie di cellule cresciute in condizioni diverse.

INFLUENZA DELLO XILOSIO SULL'ATTIVITA' RESPIRATORIA DEL LIEVITO IN PRESENZA DI GALATTOSIO

Questa ricerca venne effettuata onde controllare l'influenza eventualmente esplicita da uno zucchero affatto inutilizzato, come lo xilosio, sulla utilizzazione, come semplice substrato respiratorio, di uno zucchero, quale il galattosio, che non viene fermentato dal lievito (salvo eventuale abitudi-

mento). L'esperienza ha rivelato anche qui una spiccata influenza, nonostante si sia impiegato una sospensione di lievito ottenuta da cultura su agar malto; essa è apparsa (tab. VIII, diag. 5 *a, b*) come un aumento del consumo di ossigeno in tutte le prove, ma non si può escludere che essa possa esplicarsi anche in senso opposto, come già si è visto per la coppia glucosio-xilosio.

INFLUENZA RECIPROCA DI GLUCOSIO E GALATTOSIO SULLE ATTIVITA' RESPIRATORIE E FERMENTATIVE DEL LIEVITO

In due esperienze (tab. IX e X; diagr. 6 e 7) effettuate con il lievito ottenuto da culture in brodo malto, si potè constatare che il galattosio intensifica i processi respiratori e contemporaneamente deprime quelli fermentativi; ma poichè lo zucchero medesimo, di per sè alimenta più intensamente la respirazione, i risultati sperimentali potrebbero anche significare che sia la presenza del glucosio a deprimere l'attività ossidativa a carico del galattosio. Tuttavia il quesito e così pure altri aspetti del fenomeno potrebbe essere chiarito precisando parallelamente il grado di attacco dei due zuccheri da parte del lievito.

RIASSUNTO E CONCLUSIONI

Le ricerche vennero condotte con il metodo manometrico di Warburg, impiegando un ceppo di *Sacch. ellipsoideus*.

Venne indagata l'influenza esplicita da basse concentrazioni di glucosio sull'attività respiratoria.

Con il diminuire della concentrazione al di sotto dell'1% la respirazione subisce modificazioni di intensità più o meno accentuate; esse dipendono dallo stato fisiologico del lievito e dalla massa microbica presente e sono verosimilmente in rapporto con il potenziale redox che si stabilisce nel substrato.

L'influenza è apparsa come determinata da due stimoli opposti e diversamente prevalenti tendenti, con il diminuire della concentrazione, l'uno alla diminuzione, l'altro all'aumento degli scambi respiratori.

Con altre esperienze si è voluto indagare l'influenza esplicita dallo xilosio sulla respirazione in presenza di glucosio a basse concentrazioni.

Anche lo xilosio (che di per sè non è utilizzato) in presenza di glucosio influenza la respirazione, esaltandola o deprimendola analogamente a quanto si verifica con il solo glucosio, cioè in funzione di due stimoli opposti e diversamente prevalenti.

SUMMARY

The researches have been conducted with the manometric method of Warburg, using a strain of *Sacch. ellipsoideus*.

These studies had the purpose to determine the influence of low glucose-concentrations on the respiratory activity.

When the concentration is decreasing below 1% the respiration undergoes more or less accentuated modifications of intensity; they are depending upon the physiological state of yeast and of the present microbic mass, and are likely in relation with the redox-potential establishing in the substract.

The influence has appeared to be decided by two opposite stimulations, which are diversely prevailing and with the diminution of concentration are inclined, one to decrease and the other to increase the respiratory exchanges.

Other researches have had the purpose to examine the influence explained on the respiration by xylene in the presence of glucose at low concentrations.

Also xylene (which alone is not utilized) in presence of glucose influences the respiration, decreasing or increasing it, in analogous way as it happened with glucose soldy, it is to say, in function of two opposite stimulations diversely prevailing.

(Pervenuto in redazione il 5-5-47).

INFLUENZA DELLA CONCENTRAZIONE ZUCCHERINA
SULLA RESPIRAZIONE DEL LIEVITO

TABELLA I

Sospensione microbica da cultura di agar malto, mgr. 0,46 in vaschetta		
	Consumo di O ₂ in mmc.	
	0'-60'	60'-120'
glucosio 1%	88,3	86,9
glucosio 0,5%	82,5	87,4
glucosio 0,25%	80,5	91,8
glucosio 0,1%	83,7	90,8

Nota. — Massa microbica di 24 ore, centrifugata 2 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 26 ore.

TABELLA II (diagr. I)

Sospensione microbica da cultura di brodo malto, mgr. 0,04 in vaschetta			
	Consumo di O ₂ in mmc.		
	0'-60'	60'-120'	120'-180'
glucosio 1%	5,9	10,3	14,0
glucosio 0,5%	— 4,0	7,3	6,6
glucosio 0,25%	13,9	13,8	15,4

Nota. — Massa microbica di 24 ore, centrifugata 4 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 29 ore.

TABELLA III (diagr. 2)

Sospensione microbica da cultura in agar malto, mgr. 0,65 in vaschetta			
	Consumo di O ₂ in mmc.		
	0'-60'	60'-120'	120'-180'
galattosio 0,75%	176,8	170,3	161,0
galattosio 0,5%	181,8	100,0	157,0
galattosio 0,25%	99,4	76,2	144,0
galattosio 0,1%	59,4	53,5	108,5

Nota. — Massa microbica di 24 ore, centrifugata 2 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 27 ore.

INFLUENZA DELLO XILOSIO
SULL'ATTIVITA' RESPIRATORIA E FERMENTATIVA
DEL LIEVITO IN PRESENZA DI GLUCOSIO

TABELLA IV (diagr. 3)

Sospensione microbica da cultura in brodo malto, mgr. 0,85 in vaschetta		
	Consumo di O ₂ in mmc.	
	Sviluppo di CO ₂ in mmc.	
	0'-60'	0'-60'
glucosio 0,5%	42,4	258,0
xilosio 1%	49,0	— 7,9
xilosio 1% + glucosio 0,5%	146,0	151,3

Nota. — Massa microbica di 23 ore, centrifugata 2 volte per 5000 giri, in ghiacciaia per 3 ore.

TABELLA V

Sospensione microbica da cultura in agar malto, mgr. 0,91 in vaschetta				
	Consumo di O ₂ in mmc.		Sviluppo di CO ₂ in mmc.	
	0'-60'	60'-120'	0'-60'	60'-120'
	glucosio 1%	197,3	161,2	470,2
xilosio 1%	47,1	32,0	— 6,0	— 8,3
xilosio 0,25% + gluc. 1%	188,6	159,5	377,5	547,0
xilosio 0,5% + gluc. 1%	206,7	168,0	390,7	624,0
xilosio 0,75% + gluc. 1%	128,0	143,3	420,7	637,0
xilosio 1% + glucosio 1%	213,7	164,1	394,0	625,0

Nota. — Massa microbica di 24 ore centrifugata 2 volte per 5000 giri, in ghiacciaia per 27 ore.

TABELLA VI

Sospensione microbica da cultura in agar malto, mgr. 0,46 in vaschetta		
	Consumo di O ₂ in mmc.	
	0'-60'	60'-120'
glucosio 1%	88,3	86,9
xilosio 0,5% + glucosio 1%	77,5	92,8
xilosio 1% + glucosio 1%	86,5	93,6
glucosio 0,5%	82,5	87,4
xilosio 0,5% + glucosio 0,5%	83,2	96,8
xilosio 1% + glucosio 0,5%	91,6	96,9
glucosio 0,25%	80,5	91,8
xilosio 0,5% + glucosio 0,25%	78,1	99,8
xilosio 1% + glucosio 0,25%	84,0	101,0

Nota. — Massa microbica di 24 ore, centrifugata 2 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 26 ore.

TABELLA VII (diagr. 4 a, b, c)

Sospensione microbica da cultura in brodo malto, mgr. 0,04 in vaschetta			
	Consumo di O ₂ in mmc.		
	0'-60'	60'-120'	120'-180'
glucosio 1%	5,9	10,3	14,0
xilosio 0,5% + glucosio 1%	4,6	10,6	10,7
xilosio 1% + glucosio 1%	— 2,1	9,1	11,9
glucosio 0,5%	— 4,0	7,3	6,6
xilosio 0,5% + glucosio 0,5%	6,1	14,0	13,1
xilosio 1% + glucosio 0,5%	11,7	18,3	20,3
glucosio 0,25%	13,9	13,8	15,4
xilosio 0,5% + glucosio 0,25%	0,8	9,5	14,3
xilosio 1% + glucosio 0,25%	3,9	9,3	11,2

Nota. — Massa microbica di 24 ore, centrifugata 4 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 29 ore.

INFLUENZA DELLO XILOSIO
SULL'ATTIVITA' RESPIRATORIA DEL LIEVITO
IN PRESENZA DI GALATTOSIO

TABELLA VIII (diagr. 5 a, b)

Sospensione microbica da cultura in agar malto, mgr. 0,65 in vaschetta			
	Consumo di O ₂ in mmc.		
	0'-60'	60'-120'	120'-180'
galattosio 0,75%	176,8	170,3	161,0
xilosio 0,25% + gal. 0,75%	226,7	178,2	176,0
galattosio 0,5%	181,8	100,0	157,0
xilosio 0,5% + gal. 0,5%	184,1	113,6	164,0
galattosio 0,25%	99,4	76,2	144,8
xilosio 0,75% + gal. 0,25%	133,3	134,1	205,6
galattosio 0,1%	52,4	53,5	108,5
xilosio 0,9% + gal. 0,1%	69,6	58,8	121,8

Nota. — Massa microbica di 24 ore, centrifugata 2 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia 27 ore.

INFLUENZA RECIPROCA DI GLUCOSIO E GALATTOSIO
SULL'ATTIVITA' RESPIRATORIA E FERMENTATIVA
DEL LIEVITO

TABELLA IX (diagr. 6)

Sospensione microbica da cultura in brodo malto, mgr. 0,85 in vaschetta		
	Consumo di O ₂ in mmc.	
	0'-60'	Sviluppo di CO ₂ in mmc. 0'-60'
galattosio 1%	217,5	39,9
galattosio 1% + glucosio 0,5%	200,8	142,4
glucosio 0,5%	42,4	258,0

Nota. — Massa microbica di 23 ore, centrifugata 2 volte, per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 3 ore.

TABELLA X (diagr. 7)

Sospensione microbica da cultura in brodo malto, mgr. 0,04 in vaschetta			
	Consumo di O ₂ in mmc.		
	0'-60'	60'-120'	120'-180'
galattosio 1%	13,0	10,8	18,8
glucosio 0,5%	— 4,0	7,3	6,6
galatt. 1% + glucosio 0,5%	4,5	9,7	12,9
glucosio 0,25%	13,9	13,8	15,4
galatt. 1% + glucosio 0,25%	27,9	28,2	30,1

Nota. — Massa microbica di 24 ore centrifugata 4 volte per 15' a 5000 giri, in ghiacciaia per 29 ore.

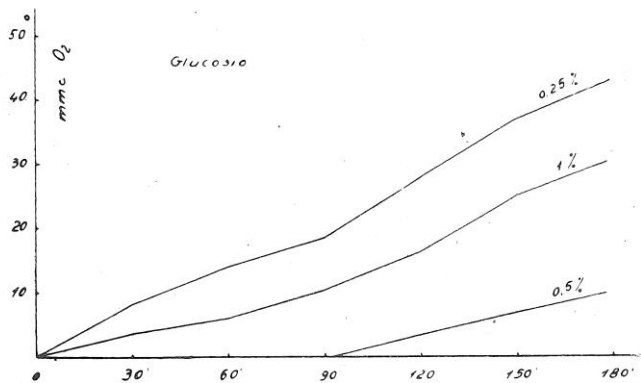


DIAGRAMMA 1 (Tab. II)

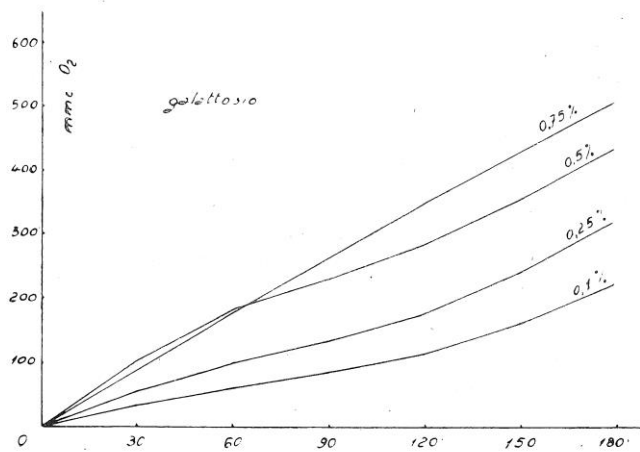


DIAGRAMMA 2 (Tab. III)

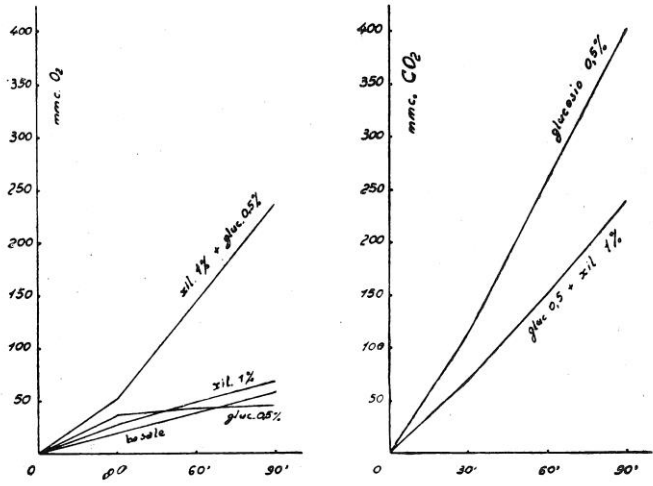


DIAGRAMMA 3 (Tab. IV)

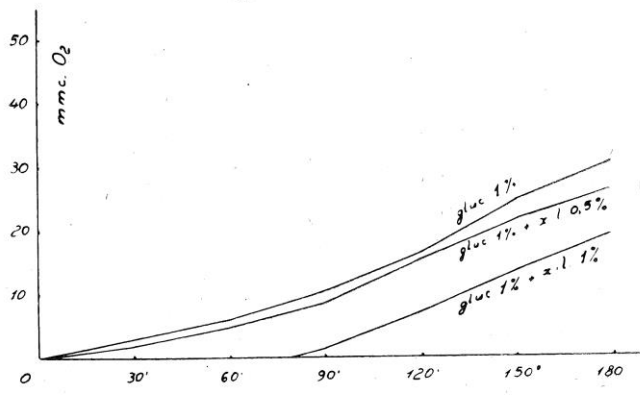


DIAGRAMMA 4 a (Tab. VII)

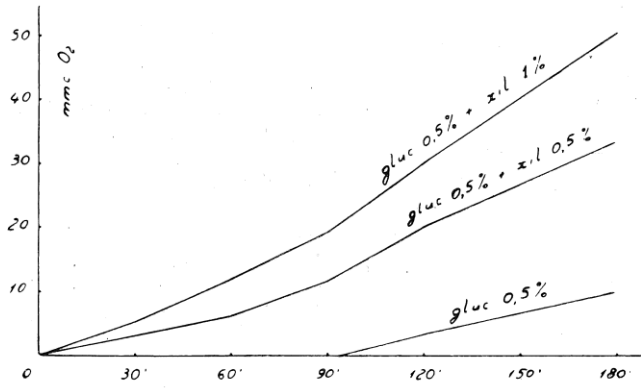


DIAGRAMMA 4 b (Tab. VII)

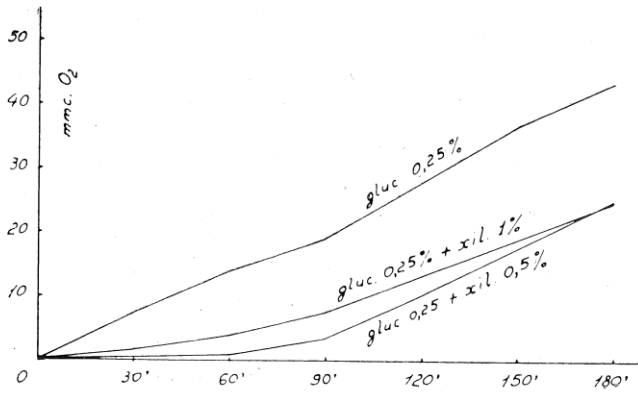


DIAGRAMMA 4 c (Tab. VII)

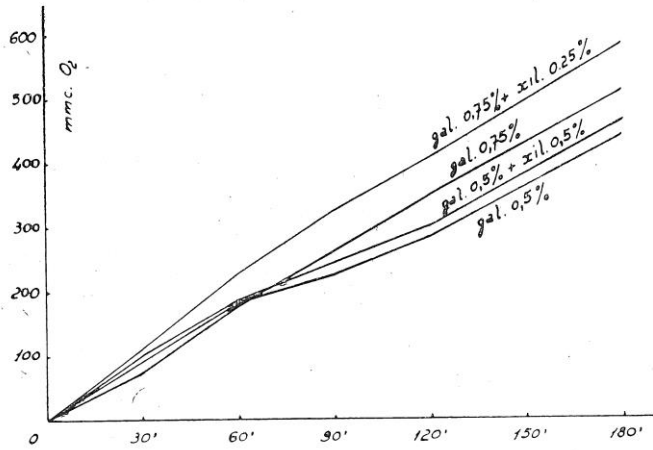


DIAGRAMMA 5 a (Tab. VIII)

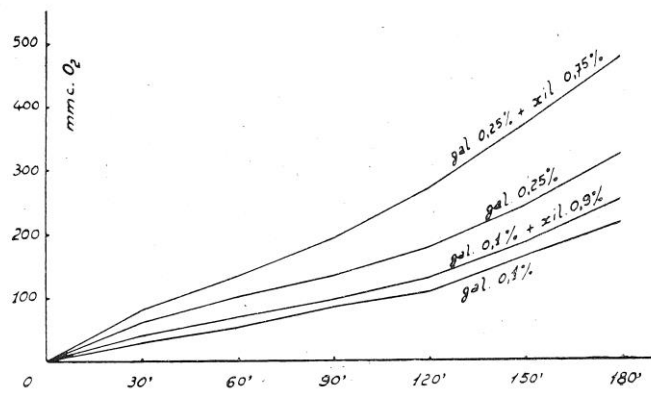


DIAGRAMMA 5 b (Tab. VIII)

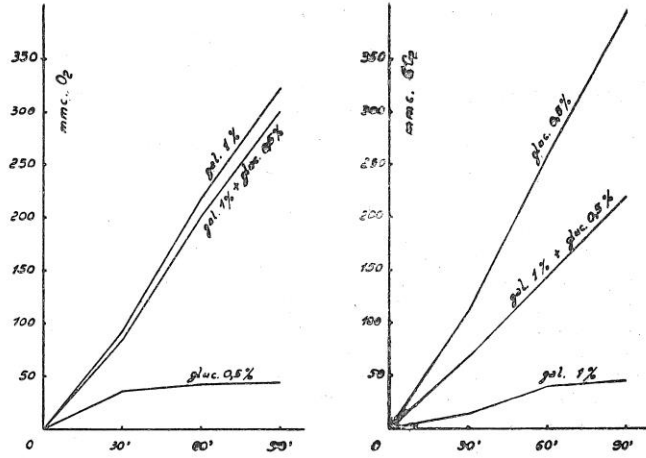


DIAGRAMMA 6 (Tab. IX)

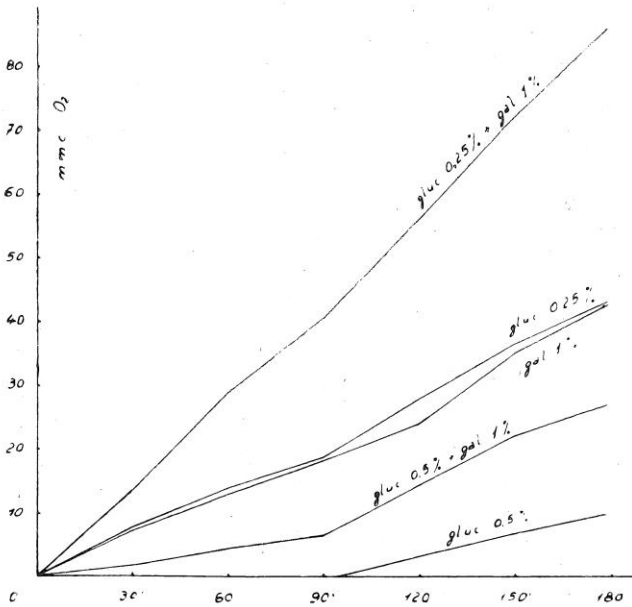


DIAGRAMMA 7 (Tab. X)

Ricerche su alcuni micròbi del terreno ad attività ossidative

V. Treccani - C. Colla

E' noto che nel terreno agrario sono presenti, oltre alle sostanze umiche propriamente dette, una serie di prodotti organici, come alcool, zuccheri acidi grassi, composti ciclici ed eterociclici, che, o come tali o attraverso i loro prodotti di trasformazione intermedia, si originano nel terreno, durante la decomposizione microbiologica degli organismi animali e vegetali. Per molte delle suddette sostanze (alcooli, zuccheri, acidi, ecc.) si conoscono con sufficiente chiarezza i processi biologici di decomposizione, cioè si conoscono gli agenti microbici che presiedono ai processi medesimi, attraverso reazioni fermentative e ossidative di cui pure si ha per lo meno l'idea del meccanismo chimico.

Di altre sostanze, invece, il processo di mineralizzazione ci è ben poco noto; si sa che esso è operato da microrganismi, ma poco o nulla si conosce della natura e delle attività biochimiche dei germi, che, in modo specifico o non, presiedono a tale mineralizzazione.

Già diversi autori hanno studiato la decomposizione biologica degli idrocarburi e dei loro derivati; così: Söhngen (1), Störmer (2), Wagner (3) isolarono e descrissero microrganismi capaci di moltiplicarsi in presenza di benzolo, petrolio, olio di paraffina, tuluolo, xilolo, gas illuminante, fenolo, ecc. Perrier (4), riferendosi alle sue osservazioni circa l'azione ossidante degli eumiceti e schizomiceti sui composti della serie ciclica, (acido benzoico, salicilico e fenico) suppone che come termini intermedi di tali composti, normalmente esistenti nei vegetali e negli animali superiori, da cui possono passare al terreno in proporzioni non trascurabili, si formino dei corpi probabilmente vicini ai polifenoli, i quali in ambiente neutro o leggermente alcalino e sotto l'azione dell'ossigeno atmosferico si trasformerebbero in una materia colorante nera. Muschel (5) dimostrò che il *B. mesentericus* Niger produce corpi neri a partire da anelli benzenici.

Winogradsky (6) mise in evidenza l'ossidazione dell'acido benzoico mediante l'*Azotobacter* con formazione di un corpo nero.

Guittonneau e Chevalier (7) provarono l'*Azotobacter* su fenolo ed acido salicilico e trovarono pure formazione di corpo nero. Pochon e Tchan (8) hanno messo in evidenza l'ossidazione dell'acido benzoico nel suolo e dosando la quantità di humus di un terreno agrario prima e dopo la crescita di *Azotobacter* in presenza di benzoato di Na, hanno notato un aumento di sostanza umica.

In complesso però come si è detto le conoscenze acquisite in questo campo sono piuttosto sommarie, sia dal punto di vista microbiologico che

da quello biochimico; e perciò in vista di una più ampia sperimentazione, si è voluto recare un contributo preliminare allo studio dei processi di decomposizione di alcuni composti della serie aromatica (benzolo, toluolo, xilolo evv.) che notoriamente agiscono come antisettici sulla maggior parte dei germi.

Con la presente nota si riferiscono i risultati di un primo nucleo di ricerche relative all'isolamento in cultura pura di germi capaci di agire su codeste speciali sostanze, al loro carattere morfologico e culturale, nonché al loro comportamento di fronte alle sostanze medesime fornite con esclusivo substrato organico.

PARTE SPERIMENTALE

CULTURE DI ARRICCHIMENTO IN PRESENZA DI TOLUOLO

Come materiale microbico di partenza vennero usati terra e letame; come liquido culturale la seguente soluzione salina: KH_2PO_4 gr. I, NH NO_3 gr. I, MgSO_4 gr. I, CaCO_3 gr. 0,5, H_2O cc. 1000. A provettoni contenenti cc. 20 della predetta soluzione salina si aggiunse qualche mgr, di terra o di letame; questi provettoni, unitamente ad una provetta aperta contenente del toluolo, vennero posti in un recipiente di vetro chiuso, in termostato a 37° ; in tali condizioni l'atmosfera dei recipienti si saturava di vapori di toluolo. Così dopo alcuni giorni si è potuto constatare una crescita microbica variamente abbondante a seconda del materiale di semina. Con successivi trapianti eseguiti nelle medesime condizioni sperimentali, si sono potute, tra l'altro fare le seguenti constatazioni:

La moltiplicazione dei germi avveniva prevalentemente alla superficie del liquido sotto forma di pellicola fragile la quale, pur rompendosi e precipitando al fondo del provettone, veniva a riformarsi successivamente.

La moltiplicazione dei germi nei successivi trapianti aveva inizio solo con semine abbondanti, oppure in seguito ad aggiunta di piccole quantità di sostanze facilmente utilizzabili come glucosio, acetato di sodio, autolisato di lievito.

Occorreva però dimostrare che le culture ottenute utilizzavano effettivamente il toluolo; una lieve crescita si aveva infatti anche nelle provette di controllo il che stava ad indicare che il liquido culturale conteneva, indipendentemente dalla presenza di toluolo, tracce di sostanze organiche utilizzabili dai germi.

A tal fine è dato che con una semina molto abbondante non era del tutto sicuro l'accertamento della eventuale crescita a spese del toluolo, si è pensato di procedere ad un progressivo ingrandimento della cultura in base al seguente principio:

Se ad un dato volume di cultura microbica si aggiunge a regolari intervalli di tempo, liquido nutritizio, in modo da raddoppiare ogni volta il volume, è possibile, data la moltiplicazione dei germi, mantenere almeno costante la densità microbica iniziale, nonostante il progressivo ingrandimento della cultura medesima. Naturalmente questo è possibile solo quando i microrganismi trovano nel liquido aggiunto tutte le sostanze minerali in-

dispensabili, ed almeno un composto di C assimilabile, in quantità sufficiente per alimentare l'accrescimento voluto. Se invece tale sostanza organica dovesse mancare, la massa microbica di partenza, restando sempre la stessa, si diluirà sempre più, fino a scomparire praticamente del tutto. Se infine nel liquido aggiunto si ha la presenza di una o anche di più sostanze organiche, ma in quantità insufficiente, la densità microbica di partenza risulterà ancora in progressiva diminuzione, senza però scomparire praticamente del tutto, ma tendendo a stabilizzarsi in proporzione della disponibilità più o meno lieve dell'alimento organico. Pertanto, effettuando siffatti ingrandimenti riesce praticamente agevole e sicuro riconoscere l'attitudine di dati germi ad utilizzare una determinata sostanza come fonte di C.

Si procedette quindi con le seguenti modalità: a due provette uguali vennero aggiunte per ognuna cc. I di una cultura microbica a pieno sviluppo (proveniente da uno dei trapianti soprammenzionati) e cc. I della soluzione salina; una provetta fu posta in ambiente di toluolo, l'altra fu tenuta come controllo. Dopo 8 giorni si aggiunsero ad entrambe le provette cc. 2 della soluzione salina, così da raddoppiarne il volume, mantenendo sempre i recipienti nelle condizioni di partenza, ad intervalli regolari di 8 giorni si portarono i volumi a cc. 8, 16, 32, 64 ecc., trasportando le culture in recipienti appropriati mano a mano che il volume del liquido lo richiedeva.

In queste condizioni si è potuto constatare che già quando gli ingrandimenti avevano raggiunto i 32 cc., la massa microbica di partenza nel controllo poteva ritenersi praticamente scomparsa, mentre la cultura in presenza di toluolo presentava sempre uno sviluppo pressochè costante. Con questa esperienza l'effettiva utilizzazione del toluolo non poteva più lasciare alcun dubbio.

Come già è stato detto, si era osservato che con semina non abbondante la moltiplicazione dei germi, in presenza di toluolo, era favorita dall'aggiunta iniziale di sostanze facilmente utilizzabili; questo faceva supporre che l'utilizzazione del toluolo avvenisse solo quando la massa microbica aveva raggiunto una certa densità rispetto al liquido culturale. Questa osservazione suggerì la seguente esperienza:

A tre serie di provettoni contenenti 20 cc. della solita soluzione salina si aggiunsero rispettivamente: acetato di sodio, glucosio ed autolisato di lievito (quest'ultimo calcolato al 90% di H₂O) nelle proporzioni di 1 : 1000, 1 : 5.000, 1 : 10.000, 1 : 50.000, 1 : 100.000; effettuata la semina si posero a 37° in atmosfera di toluolo. Per ciascun tipo di sostanza impiegata e per ciascuna diluizione si allestì il relativo controllo.

Le tabelle I, II, III, danno una visione generale de risultati ottenuti.

Le concentrazioni più significative sono quelle di 1 : 5.000 e 1 : 10.000 dove il distacco tra la crescita nel controllo e quella in presenza dell'idrocarburo è notevolissima; già al secondo giorno di incubazione la moltiplicazione del germe nel controllo era terminata e la massa microbica formata precipitava sul fondo del provettone, lasciando perfettamente limpido il liquido culturale sovrastante. Viceversa in presenza di toluolo l'accrescimento microbico poteva continuare a lungo, con continue rigenerazioni delle pellicole superficiali.

ISOLAMENTI

Partendo dalle culture di arricchimento, ottenute come si è detto in precedenza, si allestirono delle culture di isolamento, usando come substrato la sopraddetta soluzione salina agarizzata, in piastre con l'aggiunta dell'1% di acetato di Na. Dalle piastre primitive vennero eseguiti successivamente nuovi isolamenti per ogni singola colonia. Poichè l'aspetto delle colonie si presentava assai diverso a seconda che lo sviluppo avveniva alla superficie o nello spessore dell'agar, le piastre vennero eseguite per striscio, anzichè per diffusione, e lo striscio venne effettuato con materiale previamente di-luito in acqua sterile ed energicamente sbattuto al fine di separare, per quanto possibile, i germi fra di loro ed ottenere colonie provenienti da un'unica cellula.

Si ottennero così due tipi di colonie :

1) Colonie tondeggianti del diametro di circa 2 mm.; con bordi irregolari ma non frastagliati e nucleo centrale tondeggiante più denso; nei primi giorni di crescita color bianco opaco, in seguito la colonia assume colorazione rosa salmone.

2) Simile alla precedente, ma con ispessimento al centro più piccolo e alone esterno più largo; color giallo chiaro.

CARATTERI MORFOLOGICI E CULTURALI

Ceppo I. - Bastoncini dritti o leggermente incurvati, con estremità arrotondate, per lo più di 1,6-2 x 0,7 μ spesso uniti a due a due e disposti a palizzata.

Colorazioni migliori con violetto di genziata e bleu di Loeffler, però il protoplasma non si colora uniformemente. Gram-positivo, non acido-resistente non produce spore, non riduce i nitrati a nitriti, non produce indolo, non dà gas nè acido dagli idrati di carbonio.

Ceppo II. - Piccoli cocchi di 0,5-0,6 μ di diametro, raramente uniti a due a due. Gram-positivi, non acido-resistenti, riduce a nitriti i nitrati, dà minime tracce di indolo, non dà gas da idrati di carbonio, forma acido da glucosio, levulosio, galattosio, arabinosio, maltosio, saccarosio (abbassamento del pH a 4,5-4,9), in minor quantità da lattosio (sino a pH 5,5 circa), destrine (pH 5,4), glicerina (pH 5,4).

PRODUZIONE DI PIGMENTO E CARATTERI CULTURALI		
	CEPPO I	CEPPO II
Sol. salina.+ acetato Na	Rosa pallido	Giallo opaco
Agar comune	Rosa pallido lucente	Giallo lucente
Agar malto	Rosa corallo - Crescita stentata	-
Agar lievito	Rosa pallido	Giallo
Agar peptone	Rosso bruno .- Crescita stentata	Giallo
Gelatina	-	Non fluidifica
Patata alcalinizzata	Rosa carne	Giallo
Latte	Rosa corallo Velo sup. Non coagula non pepton.	Giallo Velo sup. Non coagula non pepton.
Latte al tornasole	Non acidifica	Acidifica
Brodo comune	Rosa membrana superfic.	Crescita filamentosa sul fondo

Il Ceppo I, secondo la classificazione di Bergey et al. è riferibile al genere *Corynebacterium*, ma non è stato possibile identificarlo con nessuna delle specie descritte. Ulteriori indagini potranno precisare meglio la posizione sistematica del ceppo medesimo.

Il Ceppo II è identificabile, sempre secondo la classificazione di Bergey, con il *Micrococcus varians* Migula (famiglia *Micrococcaceae*).

I due ceppi furono trapiantati sia separatamente che insieme nella solita soluzione salina e mantenuti in atmosfera di toluolo; contemporaneamente furono allestiti i rispettivi controlli. Si è potuto così constatare che, mentre il Ceppo I si sviluppa agevolmente in queste condizioni, il Ceppo II assolutamente non si moltiplica; nella cultura mista si ha lo sviluppo del solo Ceppo I.

E' da notarsi che per ottenere una buona moltiplicazione delle culture di arricchimento in atmosfera di toluolo erano necessarie una reazione neutra o leggermente alcalina del mezzo culturale ed una temperatura di 37°. Variando sperimentalmente uno di questi fattori in modo da permettere una stentata moltiplicazione dei microbi, si osservava inoltre una predominanza dei cocchi sulle forme batteriche, che a loro volta apparvero modificate nella loro morfologia (forme involutive); nelle condizioni ottime di sviluppo invece si aveva una netta prevalenza di cellule batteriche uniforni e di aspetto simile a quello del Ceppo I successivamente isolato.

Infine si è osservato che se si varia uno di detti fattori, ad esempio la temperatura, nella cultura del Ceppo I in atmosfera di toluolo, si hanno, come nella cultura mista, modificazioni morfologiche ed anche la comparsa delle forme cocciche.

Questo comportamento può spiegarsi in due modi:

- il ceppo I non è in realtà una cultura pura, nonostante tutti gli accorgimenti con cui si sono eseguiti gli isolamenti;

- oppure il ceppo I è stato effettivamente isolato allo stato di purezza, ma, in condizioni di cultura non del tutto favorevoli, soggiace ad un processo di dissociazione; in tal caso la forma coccica, rappresentata dal ceppo II, non sarebbe che una variante del ceppo I, incapace di utilizzare il toluolo. Questa seconda interpretazione lascia tuttavia perplessi, date le spiccate differenze morfologiche cui si aggiungono alcune differenze culturali e fisiologiche di non poco conto (produzione di pigmento diverso e riduzione dei nitrati).

Comunque stiano le cose, è importante notare che, in condizioni favorevoli, il ceppo I si sviluppa come fosse sicuramente in cultura pura; perciò l'azione del toluolo non è da attribuire all'intervento di due germi simbiotici.

COLTURE DI ARRICCHIMENTO IN ATMOSFERA DI XILOLO E DI BENZOLO

Con la stessa tecnica usata per le esperienze in presenza di toluolo, precedentemente descritte, si sono allestite le culture in xilolo; l'isolamento in cultura pura di queste, ha consentito di ottenere un germe avente i medesimi caratteri culturali e morfologici del ceppo I sopra descritto.

In presenza di benzolo invece non si è riusciti ad ottenere che un debole sviluppo per cui non è stato possibile proseguire nelle indagini.

CONCLUSIONI

Nelle precedenti ricerche si è osservato che la massa microbica sviluppatesi alla superficie del liquido culturale si mantiene pressochè costante anche dopo molto tempo, mentre sul fondo del recipiente vanno gradatamente depositandosi le masse microbiche che soggiacciono a processi di lisi. Le culture si mantengono così in vita sino ad esaurimento di qualche componente della soluzione salina, purchè siano mantenute costantemente in presenza dell'idrocarburo voluto.

Mediante l'allestimento di culture con tracce di sostanze organiche di facile utilizzazione, nonchè mediante il metodo degli ingrandimenti progressivi, si è dimostrato necessaria la presenza di una abbondante massa microbica, affinchè a moltiplicazione dei germi abbia inizio in presenza degli idrocarburi.

La possibilità che la massa microbica via via raccoglientesi sul fondo dei recipienti culturali possa fungere, attraverso la sua progressiva lisi, da fonte di sostanze organiche nutritive e stimolanti, non può essere esclusa a priori però la deduzione della utilizzazione degli idrocarburi cementati come fonte di carbonio da parte di questi germi, non viene per altro infirmata da tale eventualità, poichè la stessa funzione alimentare da parte dei corpi microbici, poteva svolgersi nei controlli privi degli idrocarburi, nei quali invece, come è stato detto precedentemente, l'accrescimento microbico era esiguo.

Il comportamento culturale osservato, ci richiama alla mente le ben note osservazioni del Wildiers sullo sviluppo dei lieviti. Egli infatti aveva osservato che i saccaromiceti si sviluppano in soluzione di sali minerali più zucchero, solo se si semina abbondantemente oppure se si aggiunge un po' di lievito bollito. Questo comportamento del lievito è stato spiegato ammettendo che dalle cellule morte si liberi una sostanza, il cosiddetto Bios, che fungerebbe da attivatore della crescita; i principali costituenti di esso, secondo recenti indagini, sarebbero il Bios I, mesoinosite, il Bios II o biotina, non adsorbibile da carbone animale, il Bios III, frazione adsorbibile dal carbone animale, la cui attività risulterebbe legata a tracce di β -alanina e l-leucina presenti come impurità, infine inosite, aneurina ed acido pantotenico. Così è verosimile supporre che i nostri germi per crescere, in presenza di solo toluolo o xilolo, avrebbero bisogno di speciali fattori di accrescimento, che si libererebbero dalle cellule morte per autolisi. Numerosi fattori di accrescimento, analoghi a componenti del Bios, sono stati identificati per varie specie microbiche; in particolare, per quanto concerne i *Corynebacterium*, è stato accertato che essi abbisognano di acido pimelico (9).

RIASSUNTO

Si sono isolati in coltura pura degli schizomiceti capaci di utilizzare, come esclusiva fonte di carbonio, toluolo e xilolo.

Di codesti schizomiceti sono state studiate le caratteristiche morfologiche e culturali.

SUMMARY

Pure cultures of schizomycetes have been isolated, being able to utilize toluene and xylene as exclusive source of carbon.

Of these schizomycetes have been endeavoured the morphological and cultural characteristics.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Söhngen, *Centr. F. Bakt. Paras. Abteil II.* 1905-1906, v, xv.
- 2) Söhngen, *Botanisches Centralblatt.* 1907, v, 105.
- 3) Wagner, *Zeitschrift f. Garüinsphysiologie.* 1914, vol. IV.
- 4) Perrier, *Annales de la Science agronomique française et étrangère,* 1913.
- 5) Muschel, *Biochem. Zeitschr.,* 1922, 131, 570.
- 6) Winogradsky, *Ann. de l'Institut Pasteur.* 1932, 48, 39.
- 7) Guittonneau et Chevalier, *C. R. Acad. Sci.,* 1938, 206, 863.
- 8) Tochon et Y. T. Tchan, *Ann. de l'Institut Pasteur,* 1946, 2.
- 9) Arnaudi, *Elementi di microbiologia generale ed applicata alle fermentazioni.* Ambrosiana, 3^a ediz., 1947.

(Pervenuto in redazione il 15-5-47).

TABELLA I

	A (I)		A (I) + acetato Na alle concentrazioni:									
			1:1000		1:5000		1:10.000		1:50.000		1:100.000	
	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.
dopo 2 giorni	-	+	+++	+++	++	+++	+	++	+	+	-	+
dopo 4 giorni	-	+	+++	+++	++	+++	+	+++	+	+	-	+
dopo 7 giorni	-	+	+++	++++	++	++++	+	+++	+	+	-	+
dopo 10 giorni	-	+	+++	++++	++	++++	+	+++	+	+	-	+
dopo 14 giorni	-	+	+++	++++	++	++++	+	+++	-	++	-	++

TABELLA II

	A (I)		A (I) + acetato Na alle concentrazioni:									
			1:1000		1:5000		1:10.000		1:50.000		1:100.000	
	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.
dopo 2 giorni	-	+	+++	+++	++	+++	+	+	+	+	-	+
dopo 4 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	+	++	+	+	-	+
dopo 7 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	+	+++	+	+++	-	+
dopo 10 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	+	+++	+	+++	-	+
dopo 14 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	-	+++	+	+++	-	++

TABELLA III

	A (I)		A (I) + acetato Na alle concentrazioni:									
			1:1000		1:5000		1:10.000		1:50.000		1:100.000	
	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.	contr.	Tol.
dopo 2 giorni	-	+	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
dopo 4 giorni	-	+	+++	++++	++	+++	+	++	+	+	+	++
dopo 7 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	+	+++	+	++	+	++
dopo 10 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	+	+++	+	++	-	++
dopo 14 giorni	-	+	+++	++++	+	++++	+	+++	+	++	-	++

Osservazioni sul comportamento del *P. Roqueforti* Thom in presenza di Acido α Aminovalerianico

Dott. Elisa Corberi

Assistente

E' noto che sviluppo e sporificazione delle muffe dipendono in gran parte dal terreno culturale, tuttavia si verifica spesso che in terreni colturali eguali per composizione si determinano delle variazioni sia nello sviluppo che nella sporificazione di cui non si riesce a riconoscere con esattezza la causa. Si deve perciò ammettere che esistono elementi non costanti i quali possono influenzare in diverso senso le colture anche in terreni che risultano di eguale costituzione. Le ricerche del Vacirca sulla sporigenesi e sullo sviluppo delle muffe hanno messo in evidenza una relazione tra la sporificazione di certe muffe (in particolare il *P. roqueforti*) e la presenza di acido α aminovalerianico, nel terreno culturale nel senso che questo acido la inibirebbe. Questi interessanti risultati ci hanno indotto a studiare il comportamento di alcune muffe in diversi terreni di coltura in presenza e in assenza di questo aminoacido.

Abbiamo dapprima eseguito alcune prove preliminari.

Culture di *P. roqueforti* ed *A. niger* allestite in brodo malto aggiunto di acido α aminv. diedero risultati molto variabili sia riguardo all'accrescimento che alla sporificazione dipendenti, forse, dall'essere l'infuso di malto spesso ineguale a seconda della preparazione ed anche a seconda della temperatura raggiunta durante la sterilizzazione per cui ritenemmo opportuno impiegare un terreno a composizione nota.

Ci parve adatto allo scopo il liquido di Sahyun, già usato dal Vacirca nelle sue ricerche, che ha la seguente composizione: $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ gr. 4,716, glucosio 2, $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ gr. 2,72, NaCl gr. 3, NaOH n/1 cc. 0,4, MgCl_2 - FeCl_2 - CaCl_2 0,5% cc. 1, H_2O distillata a 1000 cc.; noi ne adoperammo, come già il Vacirca, la modificazione con il 20% di glucosio, anziché al 2%, percentuale più appropriata per gli schizomiceti che non per le muffe.

Pure così modificato il l. di Sahyun è un terreno povero nel quale in genere tutte le muffe da noi provate si sviluppano stentatamente con aspetto molto meno rigoglioso che in brodo malto. Appunto per questo ci parve potesse offrire il vantaggio d'essere più sensibile all'aggiunta di sostanze estranee e quindi capace di mettere in evidenza eventuali variazioni dei miceti. L'acido α aminovalerianico usato nelle nostre prove fu quello del-

l'I.S.M. confezionato sotto il nome di Vazim, che è ritenuto sufficientemente puro; del resto fu l'unico che ci fu possibile di trovare. Nelle prove fatte in precedenza cui accennavamo sopra, avevamo sempre usato le percentuali di 0,5, 1, 2, di aminoacido e la muffa da noi cimentata più frequentemente era stata il *P. roqueforti*, come quella che ci pareva mostrasse una qualche sensibilità, se pure saltuaria e non costante, alla sopraddetta sostanza. Le nostre esperienze sono state indirizzate a ricercare:

1) gli eventuali rapporti fra acidità del substrato, quantità di acido α aminovalerianico e sviluppo miceliare con relativa sporificazione in liquido di Sahyun;

2) la relazione tra consumo di azoto e sviluppo miceliare con relativa sporificazione in due serie di prove a pH costante, l'una con bassa l'altra con alta percentuale di glucosio, ambedue in presenza di quantità crescenti di acido α aminovalerianico in liquido di Sahyun modificato per maggiore concentrazione di sali;

3) il rapporto tra concentrazione del substrato culturale e germinabilità delle spore della muffa.

In l. di Sahyun opportunamente modificato a diversi pH limitati alla zona acida si sono aggiunte percentuali varie di acido α aminv., e ciascuna serie di diverso pH venne seminata con spore di *P. roqueforti*. Lo sviluppo e la sporificazione della muffa furono seguiti per un determinato periodo dopo il quale il feltro fu accuratamente asportato ed i liquidi di coltura furono sottoposti alla determinazione dello zucchero, dell'azoto totale residuo, e del pH. I pH prescelti furono 3,5; 4,5; 5; 5,5; 6; le percentuali di aminoacido 0,5; 2; 4; 6; 8.

Per rimanere il più possibile nelle medesime condizioni usammo dappertutto la stessa quantità di liquido: 100 cc. in matracci della capacità di 250 cc., tutti eguali. Ciascuna serie di pH ottenuta mediante aggiunta di H_2SO_4 e NaOH doppio normali e controllata col metodo potenziometrico, comprendeva naturalmente anche il controllo senza aminoacido. Le soluzioni dell'aminoacido vennero fatte in l. di Sahyun usando palloncini tarati da 100 cc., indi furono accuratamente versate nei matracci e subito sterilizzate a bassa temperatura (a meno di 1/2 atm. per 1/4 d'ora).

Dopo la sterilizzazione ricontrollato il pH e riportato al punto desiderato con aggiunta di soluzioni sterili dove risultava alterato, venne eseguita la semina mediante una ansata eguale per ogni matraccio di una sospensione di spore in acqua.

A scopo orientativo preparammo anche qualche altro matraccio contenente lo stesso liquido di base ma con minore percentuale di glucosio: l. di Sahyun al 2% di glucosio anziché al 20%, a pH 3,5 ed allestito con le sole percentuali di 0,5; 4; 8 di aminoacido, più un controllo seminato contemporaneamente ed allo stesso modo dell'esperienza precedente. Tutti i matracci si misero in termostato regolato a 30°; purtroppo questa temperatura non potè essere mantenuta costante per la scarsità e le frequenti in-

terruzioni della corrente dovute alla limitazione dell'energia elettrica, per cui il termostato rimase in media sui 14-20° con punte più basse anche sui 10° per periodi non brevi. Una delle prime osservazioni da noi fatte fu che il numero delle colonie che si sviluppava dalla semina che pure era stata eseguita dappertutto con la stessa quantità di spore, non era uguale, ma gradatamente diminuiva mano a mano la percentuale di aminoacido aumentava; tanto che con l'8% erano solo 3-4 le colonie che si sviluppavano in superficie e davano luogo con la loro confluenza a tutto il feltro, di contro ad un numero ben più elevato nei controlli e dove vi erano percentuali di aminoacido più basse. Inoltre l'aspetto delle colonie e poi del feltro era diverso; in tutti i controlli le colonie si presentavano sottili, asciutte, poco rilevate sul pelo del liquido, del diametro di pochi mm. mentre in presenza dell'aminoacido erano più spesse, più alte ed avevano un diametro circa doppio ed anche triplo; aspetto eguale sia con le percentuali basse (0,5) che con le alte (8). Dopo 7 giorni nei controlli a pH 3,5-4,45 il feltro era appena agli inizi mentre era già bene sviluppato in quelli a pH 5; 5,5; 6 non solo ma in parte era già sporificato, e per una superficie tanto maggiore quanto più ci si avvicinava a pH 6 dove era quasi completo; constatammo cioè che lo sviluppo e la sporificazione erano più rapidi in linea di massima mano a mano che diminuiva l'acidità di partenza. Indipendentemente da ciò dove vi era l'aminoacido notammo un'ulteriore ritardo nello sviluppo del feltro e di conseguenza della sporificazione, ritardo gradualmente più sensibile man mano le percentuali di aminoacido aumentavano, inoltre più spiccato dove il pH di partenza era più basso. Per precisare dopo 18 giorni coll'8% di aminoacido a pH 3,5 e 4,5 si era formato feltro solo su circa 1 cm. quadrato della superficie totale del liquido, a pH 5 su di 1/4 a pH 5,5 su 5/6, a pH 6 sul totale. La sporificazione seguiva alla formazione del feltro in modo più o meno tipico; si notavano spore poco pigmentate soprattutto a pH basso sia nei controlli che con il 2% di aminoacido, e di tinta un po' più scura, quasi marrone, specie con le alte percentuali di aminoacido (4-6%). Dopo 50 giorni si sospese l'esperienza; fu necessario questo tempo per ottenere dappertutto feltri discreti, perchè la temperatura inadeguata rallentò sensibilmente lo sviluppo della muffa in genere. Tutti i feltri furono tolti dai relativi matracci ed essiccati in stufa a 100° fino ad ottenere peso costante e poi pesati su bilancia di precisione. Durante queste operazioni constatammo che tutti i feltri cresciuti in presenza del 4, 6, 8% di aminoacido erano fragili, friabili, mentre gli altri avevano la solita consistenza.

Dalle pesate risultò che i diversi pH di partenza non incidevano sulla quantità del feltro formatosi, mentre invece ebbe influenza indubbia la percentuale dell'aminoacido aggiunto. Ecco i dati nella tabella n. I:

TABELLA I
PESO DEI FELTRI A DIVERSI PH
IN PRESENZA DI ACIDO α AMINOVALERIANICO

pH	3,5	4,5	5	5,5	6
<i>Controllo</i>	gr. 1,8797	gr. 0,8514	gr. 0,7555	gr. 1,1444	gr. 1,2063
0,5% di ac. aminv	» 2,9102	» 1,6683	» 2,1192	» 2,1400	» 2,1283
2 » » »	» 4,9865	» 3,7538	» 4,3048	» 3,4448	» 2,4873
4 » » »	» 1,9813	» 1,6876	» 3,5374	» 1,6028	» 1,0835
6 » » »	» 2,4519	» 3,0661	» 2,7624	» 3,0540	» 2,9156
8 » » »	» 2,8711	» 2,9316	» 2,9914	» 3,0152	» 2,7924

Confrontando con i controlli vediamo che il peso in linea di massima per l'aggiunta del 0,5% di aminoacido si raddoppia, con il 2% diventa più che triplo, con il 4, 6, 8% un po' meno che triplo. Pare quindi che qui entri in gioco la maggiore disponibilità di sostanze azotate, dovuta alla presenza dell'aminoacido, come fattore plastico, maggiore disponibilità che funziona però solo sino ad un determinato limite oltre il quale non vi è un ulteriore proporzionale incremento di peso. Potrebbe essere che altre sostanze facciano da fattore limitante ad una maggiore utilizzazione dell'azoto disponibile, tuttavia tale affermazione avrebbe bisogno di altre indagini.

pH. - Le determinazioni furono fatte con il metodo potenziometrico. Ecco i risultati nella tabella n. 2 :

TABELLA II
PH RAGGIUNTO DAI LIQUIDI CULTURALI
IN PRESENZA DI ACIDO α AMINOVALERIANICO

	<i>Controllo</i>	% di acido α aminovalerianico				
		0,5	2	4	6	8
Serie a pH 3,5	pH 1,6	pH 1,7	pH 1,7	pH 7,5	pH 7,87	pH 7,87
» » » 4,5	» 1,8	» 1,8	» 2,5	» 3,25	» 3,5	» 4,35
» » » 5	» 2	» 2,1	» 2,3	» 7,7	» 4,2	» 7,4
» » » 5,5	» 1,8	» 2,4	» 2	» 7,7	» 6,8	» -
» » » 6	» 1,75	» 2,1	» 2,2	» 7,3	» 7,15	» 6,9

Dai dati ottenuti possiamo dire che anche qui ci sembra trascurabile l'influenza del pH di partenza che probabilmente incide solo nei primi momenti dello sviluppo della muffa la quale finisce con l'acidificare i liquidi delle colture di controllo e quelli con percentuali basse di aminoacido e viceversa con l'alcalinizzare quelli con percentuali più elevate. Dello zucchero e dell'azoto abbiamo dati soltanto orientativi; sembra che anche qui il pH di partenza non influenzi i consumi che per lo zucchero hanno un andamento crescente coll'aumentare dell'aminoacido, con un massimo corrispondente al 4% e con una contrazione per le percentuali più alte. Per l'azoto pur essendo molto limitati dappertutto, sia nei controlli, sia dove vi è l'aminoacido, mostrano delle oscillazioni che hanno un minimo nel controllo (circa 0,08%) ed un massimo con il 2% di aminoacido (circa

0,24 %); ed è proprio in presenza di questa percentuale che i feltri raggiungono il loro massimo peso al quale però non corrisponde una buona sporificazione perchè è proprio col 0,5 e con il 2% di aminoacido, specie a pH più basso, che essa è piuttosto irregolare e stentata, non diversa da come si manifesta nei relativi controlli. E' con l'aggiunta del 4% di aminoacido, cui corrisponde subito una lieve diminuzione di peso del feltro, che la sporificazione tende a portarsi verso la normalità, quadro che poi con l'aumentare delle percentuali di aminoacido rimane press'a poco costante. Si direbbe quindi che in un terreno povero, della natura del l. di Sahyun, l'aggiunta di azoto sottoforma di acido α aminv. fino ad una determinata percentuale viene utilizzata come fonte di sostanza plastica, migliorando le condizioni di vita della muffa. Dal saggio orientativo eseguito facendo crescere la muffa con il 2‰ di glucosio anzichè con il 20%, a pH 3,5, abbiamo ricavato questi dati: accrescimento di poco più lento in presenza dell'aminoacido, ma poi colonie più spesse ed aspetto più rigoglioso che nel relativo controllo; sporificazione normale nel controllo, più scarsa e stentata dove vi è l'aminoacido. Altri elementi risultano dalla tabella III :

TABELLA III

	<i>Peso del feltro</i>	<i>Zucchero residuo</i>	<i>pH</i>
Controllo	gr. 0,0311	-	2,5
0,5 % ac. α aminv.	» 0,1303	-	6,2
4% » » »	» 0,2369	-	7,5
8% » » »	» 0,2377	-	7,8

L'aumento della massa miceliare in presenza dell'aminoacido è notevole, in proporzione maggiore di quello che si ebbe nella serie con il 20% di glucosio; lo zucchero è stato utilizzato completamente e la reazione del mezzo ha tendenza a spostarsi verso l'alcalinità già con il 0,5% mentre nella serie con il 20 % di glucosio, il medesimo pH si raggiunge solo con il 4% di acido, cioè con la percentuale cui corrisponde il massimo consumo di zucchero. Anche qui si direbbe che l'aminoacido è stato utilizzato come sostanza plastica: basta infatti osservare come è aumentato il peso in presenza dell'aminoacido rispetto al controllo: con il 0,5% diventa 4 volte tanto e con le altre percentuali, 4, 8%, sette volte tanto. Lo zucchero presente in quantità così esigua da poter essere completamente consumato in tutti i casi, compreso il controllo, non fornì in alcun modo il substrato per la formazione di un micelio più abbondante. Confrontando inoltre questi dati con quelli della serie, con il 20% di glucosio a pH 3,5 risulta chiaramente come il fattore limitante una maggiore utilizzazione dell'aminoacido sia proprio la bassa percentuale di glucosio (maggior peso dei feltri di questa serie rispetto alla prima). In liquido di Sahyun, cioè nelle particolari condizioni da noi sperimentate, il *P. roqueforti* in presenza di diverse percentuali di acido α aminovalerianico ed a diversi pH, si comporta come segue:

1) per quanto il suo sviluppo e la sua sporificazione avvengano un po' più rapidamente se il pH da nettamente acido si porta verso la neu-

tralità, non risulta che il pH di partenza ne influenzi il ricambio, infatti il consumo dell'azoto non varia in funzione della variazione del pH;

2) utilizza l'acido α aminovalerianico come fonte di azoto poichè il peso del suo feltro aumenta con l'aumentare dell'aminoacido messo a sua disposizione, fino ad una determinata percentuale (intorno al 2%) oltre la quale si ha una contrazione del suo consumo;

3) desamina l'aminoacido quando è presente in quantità notevole, per cui la reazione del mezzo si porta verso l'alcalinità;

4) il suo feltro aumenta di peso in modo notevole quando a parità di tutti gli altri fattori il solo glucosio è fornito in quantità maggiore;

5) consuma lo zucchero, se presente, con intensità tanto maggiore quanto più è alta la percentuale dell'aminoacido;

6) con piccole quantità di glucosio la sporificazione avviene meglio nel controllo che in presenza dell'aminoacido, mentre con forti percentuali si ottiene il risultato opposto.

2.

Nella supposizione che il fattore limitante una eventuale maggiore utilizzazione dello zucchero e dell'aminoacido potesse essere la proporzione dei sali di cui il l. di Sahyun è costituito, pensammo di vedere come si comportava la muffa in condizioni diverse da quelle nelle quali avevamo operato. Allestimo pertanto un terreno culturale in cui le percentuali dei sali fossero aumentate (3 volte il normale) mentre le quantità dell'aminoacido e del glucosio, nelle due proporzioni 2‰ e 20% rimanessero invece uguali come nell'esperienza precedente. Allo scopo di osservare il consumo dell'azoto e dello zucchero ed il comportamento della sporificazione con la maggiore possibile precisione, tutta l'esperienza fu allestita in tre esemplari, in matracci uguali per forma e capacità (250 cc.) contenenti un identico volume di liquido (100 cc.). Si prepararono due serie di liquidi di Sahyun una con il 2‰, l'altra con il 20% di glucosio ambedue a pH 3,5, ciascuna composta di un controllo e delle seguenti percentuali di aminoacido 2, 4, 6, 8. Dei tre esemplari uno servì per mettere a punto il pH dopo la sterilizzazione, per sapere, cioè, quanto acido e quanta soda andavano aggiunti per mantenere quello da noi stabilito in partenza senza bisogno di togliere liquido dagli altri matracci che pure furono regolati al punto desiderato ed inoltre per eseguire le determinazioni del pH durante ed alla fine dell'esperienza; un altro esemplare servì per la ricerca dell'azoto e dello zucchero residuo. Questi due esemplari furono seminati tutti allo stesso modo con una sola ansata di una sospensione omogenea di spore di *P. roqueforti* in acqua. Il terzo esemplare del gruppo non fu seminato, ci servì solo per cercare lo zucchero e l'azoto di controllo effettivamente presente in ciascun matraccio al principio dell'esperienza, che doveva poi fornire il dato di confronto con le quantità trovate alla fine nei matracci seminati. Tutti i matracci si misero a 30°, temperatura che, data la stagione più calda, (aprile) poté essere mantenuta quasi costante, tanto che dopo 35 giorni si sospese l'esperienza perchè l'aspetto dei feltri era in tutto simile a quello raggiunto nella prova precedente. Anche qui osservammo

che il numero delle spore germinate diminuiva con l'aumentare della percentuale dell'aminoacido in modo più evidente soprattutto nella serie con il 20% di glucosio.

Nella serie con il 2% di glucosio, dove vi era l'aminoacido la muffa si era sviluppata più abbondante e più rigogliosa che nel controllo, ma press'a poco nello stesso tempo formando colonie del diametro di circa tre volte quello del relativo controllo, e mentre in questo tutta la superficie era diventata rapidamente verde, negli altri la sporificazione fu più lenta ed irregolare ed il colore delle spore rimase più o meno grigio verde. Le parti del feltro rimaste più chiare furono controllate al microscopio e dappertutto si constatarono spore. Complessivamente tutti questi feltri erano più sottili e più minuti di quelli della serie con il 20% di glucosio.

Nella serie con il 20% di glucosio, dove vi era l'aminoacido notammo lieve ritardo nello sviluppo del feltro che in seguito divenne più abbondante e più rigoglioso che nel suo controllo. La sporificazione fu poco pronunciata nel controllo e con il 2% di aminoacido, mentre con le altre percentuali fu più o meno normale; feltro e spore avevano un colore piuttosto bruno. Guardammo al microscopio i feltri del controllo e quelli cresciuti con il 2% di aminoacido, rimasti pressochè bianchi e constatammo la presenza di numerose spore. I recipienti della serie destinata alla ricerca dello zucchero, dell'azoto e del peso del feltro vennero aperti solo alla fine dell'esperimento. La ricerca dello zucchero fu eseguita con il metodo del Feling-Bertrand, quella dell'azoto totale con il metodo di Kieldal, l'azoto ammoniacale per distillazione; le determinazioni del pH con il metodo potenziometrico. I consumi sono stati calcolati sottraendo di volta in volta il dato trovato nel liquido dove era cresciuta la muffa da quello trovato nel corrispondente matraccio sterile.

TABELLA IV

<i>Liquido di Sayhum con 2% di glucosio</i>	<i>Peso del feltro</i>	<i>Zucchero consumato</i>	<i>pH</i>	<i>Azoto totale consumato</i>	<i>Azoto ammoniac.</i>
Controllo	gr. 0,0460	tutto	3,3	-	+ 0,004
2% di ac. α aminv.	» 0,2432	»	7,45	0,0611	+ 0,1207
4% » » » »	» 0,1226	»	7,45	-	+ 0,1296
6% » » » »	» 0,1256	»	7,45	-	+ 0,1415
8% » » » »	» 0,1327	»	7,45	0,0126	+ 0,1616
<i>Liquido di Sayhum con 20% di glucos.</i>					
Controllo	1,0984	5,16	1,9	0,0809	- 0,1077
2% di ac. α aminv.	3,3650	14,56	1,9	0,3027	- 0,1615
4% » » » »	3,0560	17,617	7,5	0,2694	+ 0,0979
6% » » » »	2,8292	16,954	7,45	0,2362	+ 0,2553
8% » » » »	2,7685	13,707	7,0	0,2647	+ 0,0564

Esaminando i risultati troviamo quanto segue.

Serie con il 2% di glucosio. - Lo zucchero è stato consumato com-

pletamente dappertutto, il pH è rimasto basso solo nel controllo, cioè dove non vi è l'aminoacido, mentre dove è presente il pH si è elevato oltre 7 essendo aumentato l'azoto ammoniacale; l'azoto totale è diminuito in tutte le culture in quantità trascurabile, quasi nell'ordine di grandezza dell'errore sperimentale e in quantità un po' più ponderabili solo in presenza del 2% di aminoacido; ma che queste piccole quantità siano sufficienti a produrre un migliore sviluppo della muffa è dimostrato dal sensibile aumento del peso dei feltri. Con il 2% di aminoacido il peso del feltro è aumentato di 5 volte e di circa 2 volte e mezzo con le altre percentuali.

Serie con il 20% di glucosio. - Il consumo dello zucchero ha un andamento simile a quello intravisto nella prima prova, con l. di Sahyun normale a diversi pH.

PERCENTUALI DEL GLUCOSIO CONSUMATO RISPETTO AL GLUCOSIO TOTALE PRESENTE

Controllo	28 %
2% ac. α aminv	80 %
4% » » »	97,2 %
6% » » »	94,9 %
8% » » »	83,3 %

Anche qui il consumo massimo non corrisponde alla formazione del feltro più pesante, ma avviene in presenza del 4% di aminoacido, cioè quando inizia la formazione dell'azoto ammoniacale e la reazione del mezzo diventa alcalina. La maggiore utilizzazione dell'azoto si ha invece in presenza del 2% di aminoacido con il consumo del 0,3% di azoto cui corrisponde la formazione del feltro più pesante, tre volte quello del suo controllo; a dosi maggiori di aminoacido corrispondono invece consumi di azoto inferiori, intorno a 0,25, con formazione di un feltro circa due volte e mezzo quello del controllo. La differenza del peso dei feltri dei due controlli (2% e 20% di glucosio), dovuta esclusivamente allo zucchero è di 23 volte; ed è invece di circa 60 volte quella tra il feltro del controllo con il 2% di glucosio e quelli con il 20% di glucosio ed in più l'aminoacido. Questi risultati sono analoghi a quelli trovati nella precedente esperienza con l. di Sahyun normale, infatti anche qui l'aggiunta dell'aminoacido dà luogo a: 1) aumento sensibile del peso del feltro del *P. Roqueforti* che procede di pari passo con l'aumento dell'aminoacido messo a sua disposizione fino ad una determinata percentuale (2%) oltre la quale non viene utilizzato proporzionalmente; 2) formazione di azoto ammoniacale e reazione alcalina quando l'aminoacido è presente in quantità elevate; 3) aumento sensibile di peso del feltro quando a parità di tutti gli altri fattori il solo glucosio è fornito in quantità maggiore; 4) maggiore consumo dello zucchero in presenza di una più alta percentuale dell'aminoacido; 5) sporificazione diversa a seconda che il liquido colturale è povero o ricco di glucosio; nel primo caso sembra divenire più irregolare, nel secondo invece tende a migliorare rispetto al suo controllo. Dobbiamo quindi concludere che l'aver aumentato di tre volte la concentrazione dei

sali del *L. di Sahyun* non apporta una utilizzazione più larga dell'azoto e dello zucchero; a meno che qualche altro elemento influenzante il metabolismo del micete sia sfuggito alla nostra indagine.

3.

Durante queste esperienze avevamo constatato come il numero delle spore che germinava in presenza di percentuali crescenti di aminoacido gradatamente diminuiva rispetto al controllo. Ci venne il dubbio che questo non dipendesse da particolari proprietà antisettiche dell'aminoacido ma da alterazioni fisiche del terreno culturale, dovute solo alla forte concentrazione della soluzione, ostacolanti la germinabilità. Abbiamo allora eseguito un'ultima prova a scopo orientativo; semina della muffa nello stesso terreno sintetico aggiunto di forti percentuali di un'altra sostanza azotata, plastica, in sostituzione dell'acido α aminvalerianico: il peptone.

Al medesimo liquido di *Sahyun* più concentrato aggiungemmo peptone in diverse proporzioni: 5, 10, 15, 20 %. Tutta la prova fu eseguita con le medesime modalità delle precedenti. Eccone i risultati. Con l'aumentare delle percentuali di peptone si verificò in ambedue le serie una diminuzione sensibile del numero delle spore germinanti; inoltre nella prima serie lieve ritardo nella formazione del feltro che in seguito si fece più abbondante del relativo controllo, e sporificazione come nel controllo; nella seconda serie, in presenza del peptone, lieve ritardo nella formazione del feltro che in seguito si ispessì e sporificò meglio che nel suo controllo dove rimase di colore piuttosto biancastro. Raccogliendo i feltri per la pesata si constatò una maggiore fragilità con le percentuali più alte di peptone (10-15-20%).

Nella tabella V diamo gli altri risultati:

TABELLA V

<i>L. di Sahyun + 2% di glucosio</i>				<i>L. di Sahyun + 20% di glucosio</i>		
	<i>Peso dei feltri</i>	<i>Zucchero residuo</i>	<i>pH</i>	<i>Peso dei feltri</i>	<i>Zucchero residuo</i>	<i>pH</i>
Controllo	gr. 0,718	-	3,35	gr. 1,9630	11,35	1,9
5% peptone	» 0,3098	-	7,4	» 4,5136	0,880	1,6
15% »	» 0,5101	-	7,45	» 4,5306	0,258	7,7
10% »	» 1,2884	-	7,45	» 3,7992	0,527	7,6
20% »	» 1,6054	-	7,45	» 4,9240	0,761	7,6

Nel complesso osserviamo un discreto parallelismo tra quello che avviene in presenza dell'aminoacido e del peptone: aumento del feltro rispetto ai relativi controlli dovuto al peptone, maggiore nella prima serie e minore nella seconda; maggiore consumo dello zucchero in presenza del peptone; e diminuzione della germinabilità delle spore proprio come con l'aminoacido. Per cui come il peptone che non è dotato di particolari proprietà antisettiche in forti dosi può ostacolare la germinazione di spore, così è probabile che in analoghe condizioni si comporti anche questo aminoacido.

RIASSUNTO

In un terreno culturale sintetico, il liquido di Sahyun, in presenza di basse e di alte percentuali di glucosio è stata osservata l'influenza dell'acido α aminovalerianico in rapporto all'accrescimento ed alla sporificazione del *P. roqueforti*. Nelle particolari condizioni in cui i risultati sono stati ottenuti pare che:

1) l'aggiunta dell'aminoacido nelle proporzioni del 0,5, 2, 4, 6, 8 %, in presenza del 2‰ e del 20% di glucosio, provochi notevole incremento delle culture solo fino alla dose del 2% e successivamente, lo riduca a proporzioni minori, tuttavia mantenendo le culture sempre ad un livello più alto del controllo. La sporificazione per contro diviene più irregolare, specie con le dosi più alte di aminoacido, in presenza del 2‰ di glucosio, mentre viene favorita in presenza del 20% di glucosio rispetto al suo relativo controllo. Si direbbe quindi che in queste condizioni l'aminoacido in presenza di glucosio a bassa e ad alta concentrazione sia utilizzato come sostanza plastica e provochi fino ad un certo punto un'attivazione del ricambio nutritivo del *P. roqueforti*;

2) l'aumento di tre volte della concentrazione dei sali del liquido di Sahyun non dà luogo ad una utilizzazione più larga dell'azoto e dello zucchero.

3) la diminuzione della germinabilità delle spore della muffa in presenza delle percentuali più alte dell'aminoacido è notevole ed, è paragonabile a quella che si manifesta anche con soluzioni concentrate di altre sostanze, come il peptone.

SUMMARY

With Sahyun liquid, synthetic cultural medium, and using low and high percentages of glucose a study has been made of influence of aminovalerianic acid on the growth and sporification of the *P. roqueforti*. Given the particular conditions in which the results were obtained it appears that:

1) The addition of aminoacid, in the proportion of 0,5 - 2 - 4 - 8%, in the presence of 2‰ and 20% of glucose causes a considerable increase in the cultures when the dose does not exceed 2%, a higher percentage reduces the cultures to lesser proportions, while still maintaining them at a higher level than that of the control. On the other hand, the sporification becomes more irregular especially in cases of higher doses of aminoacid, in the presence of 2‰ glucose, whereas in the presence of 20% glucose, the sporification is favourable when compared with the corresponding control. It would appear therefore that in these conditions aminoacid, where high and low concentrations of glucose are present, acts as a plastic substance and, to a certain degree, sets in motion the nutritive process of the *P. roqueforti*.

2) The increase to three times the concentration of the Sayhun liquid salts does not cause a greater consumption of azote or of sugar.

3) The decrease in the power to germinate of the mould spores where a higher percentage of aminoacid is present, is considerable and is comparable to that which is also found in other solutions concentrated of substances such as peptone.

BIBLIOGRAFIA

- F. Vacirca, *Sulla sporigenesi*. Soc. It. Biol. Sper. 21-II-1944.
— *Azione di alcuni aminoacidi sullo sviluppo degli Schizomiceti e degli Ifomiceti*. Giorn. Batt. Imm. n. II-12, 1944.
— *Attività antimicrobica della norvalina in vitro ed in vivo*. Boll. Ist. Sier. Mil. Vol. XXIV, Fasc. gennaio-giugno 1945.
— *Sostanze ad azione antimicrobica funzionale*. Boll. I.S.M., vol. XXIV, fasc. gennaio-giugno 1945.
- F. Vacirca e A. Spiga, *Azoto aminico del terreno e sviluppo dei microrganismi*. Vol. XXXVIII. Path., 1946.
- M. Marmorì, *Sul meccanismo d'azione delle sostanze antimicrobiche*. Boll. I.S.M., vol. XXIV, fasc. gennaio-giugno 1945.

(Pervenuto in redazione il 10-6-47).

Apparecchiatura elettrica sostitutiva il becco Bunsen o la lampada ad alcool nelle operazioni di isolamento e di trapianto dei microrganismi

Carlo E. Malan

La recente guerra e l'attuale periodo post-bellico hanno imposto gravi limitazioni alla continuazione delle ricerche microbiologiche anche in quei laboratori cui sono state risparmiate serie distruzioni.

Fra queste limitazioni, non ultima in importanza, è stata la graduale scomparsa dei mezzi di riscaldamento necessari alla effettuazione della semplice, ma indispensabile, sterilizzazione del filo di platino, dell'imboccatura e dei tappi di cotone dei tubi in uso per l'isolamento delle colture di microrganismi.

Soppressa l'erogazione del gas illuminante e diventati introvabili i gas in bombola (« Liquigas »), vi si sopperì con l'alcool denaturato, ma venuto a mancare anche questo, ci si trovò nell'impossibilità non soltanto di continuare gli isolamenti, ma anche di mantenere in vita, rinnovandoli, i preziosi ceppi microbici delle collezioni.

Per superare questa crisi mi sono rivolto all'utilizzazione dell'unica sorgente di energia termica la cui erogazione continuava con discreta regolarità, l'elettricità, realizzando i due apparecchi che qui descrivo ed il cui uso quotidiano si è dimostrato, alla prova, efficace, se pur non tale da sostituire, soprattutto per molteplicità di applicazioni, la classica fiamma del becco Bunsen (1).

FORNETTO PER STERILIZZARE IL FILO DI PLATINO

Ho dovuto scartare l'idea di raggiungere l'arrossamento del filo di platino coll'inserirlo in una resistenza elettrica, di cui avrebbe fatto parte chiudendone il circuito, oltre che per la difficoltà di ottenere dei sicuri, costanti ed immediati contatti, anche perchè, pur raggiungendo la sterilizzazione del tratto di filo arrossato, non avrei ottenuto contemporaneamente quella

(1) Sono debitore al Dott. G. Dallapiccola, Direttore del Laboratorio controlli delle Officine R.I.V., per i consigli e le critiche che resero possibile la prima realizzazione di questi apparecchi. Successivamente è grazie alla competenza del Prof. R. Stratta, al quale sono lieto esprimere i miei ringraziamenti, che i difetti e le manchevolezze del primo modello degli apparecchi, hanno potuto essere eliminati ed il funzionamento degli stessi grandemente migliorato.

della parte dei portafili (di vetro o di metallo con impugnatura isolante), che viene normalmente introdotta nel tubo di coltura. D'altra parte, com'è noto, non è necessario che il filo di platino raggiunga i 500° C., di cui è indice il colore «rosso nascente», perché tutti i «germi» (tanto forme vegetative che sporificate di microrganismi) su di esso eventualmente posatisi siano uccisi. A questo scopo basta la breve permanenza ai 250-300° C., se pure è preferibile il calore rosso che libera il filo, carbonizzandoli, di tutti i residui organici. Tale temperatura si può ottenere e mantenere facilmente con un fornello di semplice costruzione e funzionamento, inserito sulla normale rete dell'energia illuminante.

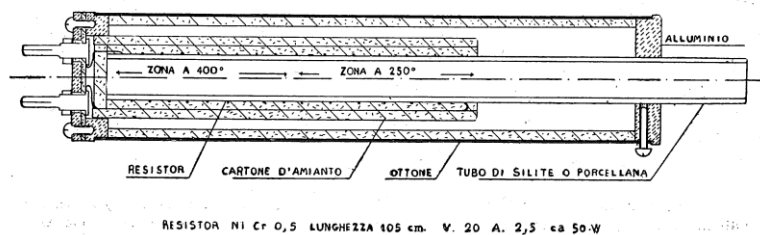
Il fornello realizzato, — rappresentato schematicamente nella fig. 1 ed in assetto di funzionamento nella fig. 3, — consiste essenzialmente di due tubi coassiali, l'uno, (di silite o di porcellana), di minor diametro, ma di maggior lunghezza, inserito nell'altro (di ottone) al fondo del quale è appoggiato con una estremità, mentre ne fuoriesce con l'altra.

Il tubo interno è circondato, per due terzi circa della sua lunghezza, da una resistenza elettrica le cui spire, molto ravvicinate al fondo del tubo, si diradano verso l'imboccatura. Al passaggio della corrente la temperatura raggiungerà i 400° C. circa verso il fondo del tubo (ove troverà posto il filo di platino), mentre il riscaldamento sarà più moderato (sui 250° C.) nel tratto mediano del tubo stesso sede della testa del portafili.

Un rivestimento coibente attorno alla resistenza ed un altro che tappezza l'interno del tubo di ottone, lasciano fra di loro un'intercapedine intesa a ridurre la dispersione del calore.

La lunghezza del fornello è calcolata in modo che il filo di platino, montato sul classico portafili di alluminio con impugnatura protetta da ebanite, occupi la zona dei 400° C., mentre la testa e la metà della parte metallica del portafili stesso (quella che dev'essere sterile perchè entra nel tubo di coltura) si trovano nella zona dei 250° C. L'impugnatura del portafili fuoriesce quasi interamente dal tubo di «silite» e rimane pertanto sempre a bassa temperatura.

Il fornello, sostenuto da quattro piedini, è tenuto in posizione orizzontale ad 8 cm. dal banco di lavoro, posizione che si è dimostrata la più pratica per l'introduzione e l'estrazione del portafili e che, contemporaneamente, presenta il vantaggio di non esporre l'imboccatura del tubo riscaldante alla caduta dei germi atmosferici.



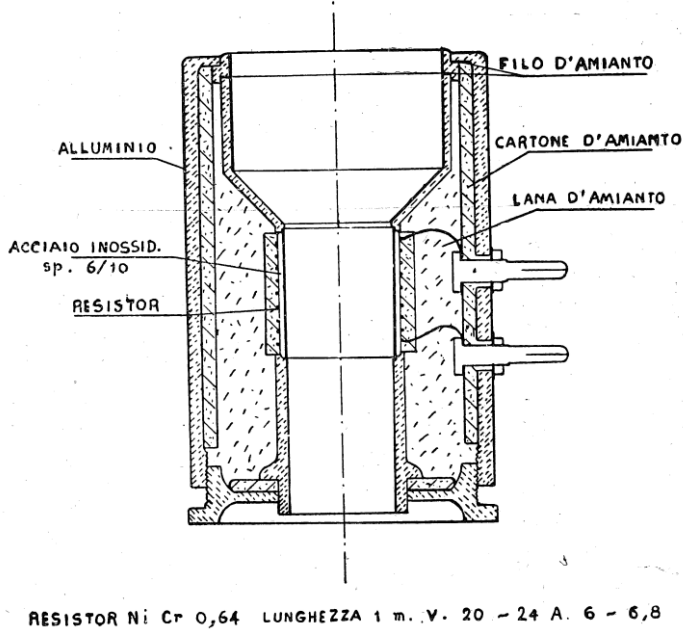
SCALA 1:2

Fig. 1. - Schema del fornello per sterilizzare il filo di platino.

FORNETTO PER LA STERILIZZAZIONE DELL'IMBOCCATURA E DEL TAPPO DI COTONE DEL TUBO DI COLTURA

La realizzazione di questo apparecchio presentava difficoltà maggiori che non quella del precedente. Lo scopo che volevo raggiungere era di portare ad una temperatura di 200° C. circa l'interno del quarto superiore del tubo di coltura (1), quello contenente il tappo di cotone, e di sterilizzare contemporaneamente l'imboccatura della provetta e, per un'altezza non superiore ad un centimetro, la parte del cotone del tappo sporgente dalla provetta stessa.

Per ottenere il leggero imbrunimento della zona del tappo sotto vetro, indice che la temperatura interna si aggira attorno ai 200° C., occorre applicare esternamente una temperatura almeno doppia, mentre invece per



SCALA 1:2

Fig. 2 - Schema del fornello per la sterilizzazione dell'imboccatura e del tappo di cotone del tubo di coltura.

(1) L'apparecchio è stato costruito per sterilizzare tubi di 20-25 mm. di diametro, in uso in questo Istituto per le colture di micromiceti, il cui rinnovo interessava in modo particolare.

la sterilizzazione dell'orlo del tubo e della superficie esterna della massa di cotone sporgente, bastava una temperatura non superiore ai 200° ad evitare la carbonizzazione del cotone.

La soluzione adottata è quella, schematizzata nella fig. 2, di infilare il tubo di coltura in un cilindro metallico, un certo tratto del quale è occupato da un anello di acciaio inossidabile (1) di altezza uguale al tratto di tubo di coltura nel cui interno si vuole raggiungere la temperatura di 200° C. Un avvolgimento di resistenze attorno all'anello di acciaio inossidabile ne porta la temperatura ai 500-600° C., sufficiente per imbrunire in poco più di 30 secondi la porzione del tappo sotto vetro. Si è poi visto che il riscaldamento prodotto da questo anello è tale che per conduzione termica la parte imbutiforme sovrastante il cilindro riscaldante, e nella quale si alloggia la parte del tappo libero dal tubo, raggiunge una temperatura capace di uccidere i germi depositatisi alla superficie del cotone.

Tutto l'apparecchio è sostenuto (come appare dalla fig. 3) da due orecchioni che ne permettono l'inclinazione sul cavalletto di sostegno, su cui è montato ad una altezza che consente al tubo di coltura introdotto di mantenere la posizione corretta nei rapporti dell'anello riscaldante e del tratto di tubo nel cui interno si vuole raggiungere la massima temperatura. Tutto l'apparecchio è smontabile col solo svitamento dell'anello inferiore di modo che ogni parte ne è facilmente accessibile per eventuali sostituzioni di resistenze (2).

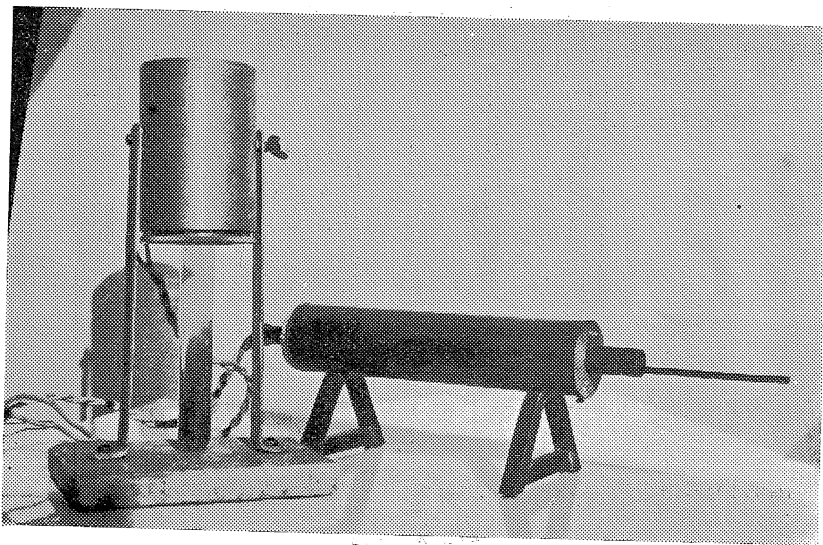


Fig. 3 - Aspetto dei fornetti in funzione con portafilo e tubo di coltura inseriti.

(1) In un primo tempo fu costruito in bronzo di alluminio, in seguito, per suggerimento del Prof. Stratta, sostituito da acciaio inossidabile che ha dato risultati migliori perchè ha potuto essere fortemente assottigliato senza perdita di inalterabilità.

(2) Accorgimento costruttivo dovuto al prof. Stratta.

FUNZIONAMENTO

Il primo modello degli apparecchi era stato dotato, per maggior semplicità, di resistenze capaci di funzionare con l'inserimento diretto sulla rete a 125 volt, ma la resistenza adatta a tale tensione era molto sottile e, malgrado si fosse impiegato materiale di ottima qualità (filo al Ni-Cr « Heräus » fuso e trafilato nel vuoto, del diam. di 0,16 mm.), bruciava troppo facilmente. Nel modello definitivo qui descritto, per ottenere una temperatura di regime più costante e una maggior durata delle resistenze, mi sono indotto ad alimentare gli apparecchi con 20-24 volt, ottenuti con un piccolo trasformatore, di circa 200 Watt, con prese su 120-160-220 volt, sacrificando così leggermente la velocità di riscaldamento ed il costo della costruzione.

Gli apparecchi raggiungono ora la temperatura di regime dopo 5-10 minuti dalla chiusura del circuito e la mantengono pressochè inalterata tutta la giornata. Un mezzo minuto di permanenza del tubo di coltura e del filo di platino nei rispettivi fornetti è sufficiente per ottenere la sterilizzazione dei punti voluti del filo di platino, nel primo caso, della testa metallica del portafili, nel secondo.

CONCLUSIONE

Come già ho fatto rilevare, questi apparecchi non sostituiscono in tutto e per tutto la fiamma del becco Bunsen, perchè questa si presta al « *flambage* » di recipienti e strumenti senza limitazioni di forme e di dimensioni, mentre i fornetti sono necessariamente costruiti per tubi di dimensioni variabili solo entro limiti di pochi millimetri e per uno strumento, il filo di platino, che forzatamente deve avere un portamanico di lunghezza leggermente superiore a quello del tubo riscaldante per potervelo collocare in posizione giusta e facilmente estrarlo.

Tuttavia l'apparecchiatura descritta ha dato, e dà, ottimi risultati nel rinnovo in serie di colture: per sicurezza di sterilizzazione, semplicità di manovra, rapidità e soprattutto grande regolarità di riscaldamento.

RIASSUNTO

Sono descritti due fornetti elettrici per sterilizzare: l'uno il filo di platino e l'estremità del relativo portafili, l'altro l'imboccatura del tubo di coltura e la parte del tappo di cotone impegnato nel tubo stesso, ideati per sostituire la fiamma del becco Bunsen o della lampada ad alcool nelle operazioni di isolamento e di trapianto dei microrganismi.

L'apparecchiatura dà buoni risultati — specie nei trapianti in serie — per la rapidità, la regolarità e la sicurezza della sterilizzazione, ma non può sostituire in tutto la fiamma, poichè, mentre questa consente la sterilizzazione di oggetti e recipienti di ogni forma e dimensione, i fornetti servono soltanto per gli oggetti per i quali furono costruiti od altri similari.

SUMMARY

The Author describes two little electrical ovens, intended to surrogate the flame, the one in the sterilisation of the platinum inoculating-needle and the part of the respective handle immediately adjoining the needle itself, the other in the sterilisation of the mouth and the cotton plug of culture tubes.

Both devices give good results in the daily practice of isolation and series-transfers of microorganisms, for the rapidity, regularity and efficiency of the sterilisation, but, being constructed to sterilize particular objects, they can't completely substitute the flame, which is efficient in the sterilisation of the mouth and the cotton plug of culture tubes.

(Pervenuto in redazione il 30-6-47).

Conservazione di preparati microbici con la vernice dell'Acetilcellulosa

(Nota tecnica)

Carlo E. Malan

L'osservazione all'immersione dei preparati schizomicetici, distesi, fissati e colorati direttamente sul vetrino portaoggetti (« strisci »), ne comporta la rapida inutilizzazione per l'accumularsi e il disseccarsi dell'olio di cedro, di cui non si può ripulire il vetrino, dopo ogni esame, senza asportarne contemporaneamente il preparato.

I mezzi applicati per conservare gli « strisci » colorati richiedono tutti manipolazioni, spesso delicate, che fanno perdere tempo e che perciò non vengono generalmente utilizzate per i preparati di uso corrente, con la conseguenza che spesso se ne scartano, per non volerli rimaneggiare, di quelli che pure l'esame microscopico avrebbe dimostrato degni di essere conservati.

Per ovviare a questo inconveniente mi sono proposto di trovare una vernice assolutamente trasparente, di rapido essiccamento capace di distendersi in uno strato così sottile da non ostacolare per nulla l'osservazione coll'immersione, perfettamente aderente ed insolubile nei solventi (benzolo, benzina), coi quali si deterge abitualmente la lente frontale dell'obbiettivo ad immersione alla fine della giornata di lavoro.

Ho dovuto scartare le vernici a base di resine di Coppale a cagione della loro scarsa solubilità nei solventi volatili (alcool, etere, cloroformio, acetone, ecc.) necessari al conseguimento della rapida essiccazione desiderata; esse, infatti, si sciolgono troppo lentamente in un miscuglio di alcool ed etere, mentre la loro solubilità in sostanze oleose non giova allo scopo sopra indicato e neppure la loro liquefazione a caldo, anch'essa estremamente lenta e che per di più ne provoca l'imbrunimento. Viceversa esse si sciolgono parzialmente nel benzolo, il che naturalmente rappresenta un grave inconveniente. Neppure ho potuto utilizzare delle soluzioni di silicato di Sodio (« vetro solubile ») perchè, oltre ad essiccare con molta lentezza (tanto varrebbe allora ricorrere al classico metodo del Balsamo del Canada e del vetrino coprioggetto), col tempo si alterano perdendo la loro trasparenza.

Le vernici a base di cellulosa in genere, di acetilcellulosa o acetato di cellulosa in particolare, presentavano caratteristiche che davano maggiori speranze di successo. L'acetilcellulosa è, ad esempio, insolubile in benzolo, alcool etilico, metilico, acqua, ecc. mentre è invece perfettamente solubile, e per di più a freddo, in molti altri solventi, fra i quali mi interessavano soprattutto l'acetone e l'acido acetico, suscettibili di rapida evaporazione già

a temperatura ordinaria, ciò che mi assicurava un altrettanto rapido essiccamento della pellicola di cellulosa.

I risultati confermarono l'aspettativa e permisero di mettere a punto la semplice tecnica qui descritta.

Si prepara una soluzione di acetato di cellulosa in acetone od in acido acetico glaciale. Più la soluzione è diluita, più sarà sottile la pellicola che si depositerà sullo « striscio », senza che la quantità maggiore di solvente che dovrà evaporare aumenti troppo la durata dell'essiccazione.

A « striscio » fissato, colorato ed essiccato, cioè pronto per l'esame microscopico, vi si fa cadere una larga goccia della soluzione. Questa si distende sulla superficie del vetrino tanto più largamente, e lasciando una pellicola tanto più sottile, quanto più è diluita.

In meno di un minuto, se si è scelto come solvente l'acetone, in pochi minuti se l'acido acetico (col vantaggio che di quest'ultimo, che non è infiammabile, si può accelerare l'evaporazione riscaldando il vetrino direttamente alla fiamma Bunsen), lo strato di vernice è secco e si può senz'altro deporvi l'olio di cedro e procedere all'esame coll'immersione.

Lo spessore della pellicola di cellulosa è così piccolo, quando si adopera una soluzione convenientemente diluita, che non disturba affatto la messa a fuoco, e la sua perfetta trasparenza non nuoce all'osservazione.

Prima di riporre il vetrino se ne asporta l'olio di cedro strofinandone la superficie con un pannolino imbevuto di benzina; lo strato di vernice è fortemente aderente e non corre il rischio di essere asportato dall'azione meccanica e neppure si riga facilmente, particolare, questo, che permette la conservazione dei vetrini in pochissimo spazio.

Dei due solventi, l'acetone e l'acido acetico, il primo evapora fin troppo rapidamente, mentre il secondo, che più lentamente si volatilizza, lascia uno strato di vernice più regolare; di più l'acido acetico esercita, com'è noto, un'azione chiarificatrice sui preparati colorati, aumentandone la nitidezza.

La soluzione di acetilcellulosa si conserva indefinitamente in recipienti di vetro ben tappati ed anche quando è diventata troppo densa per l'evaporazione del solvente, si riporta facilmente alla primitiva fluidità coll'aggiunta a freddo di un po' di solvente.

I preparati verniciati con l'acetilcellulosa sciolta in acetone o in acido acetico si conservano inalterati per molti anni: degli « strisci » tenuti in collezione da nove anni e protetti con questa vernice non hanno perso la loro nitidezza malgrado siano stati ripetutamente esaminati all'immersione ed altrettante volte strofinati con pannolini imbevuti di benzina per ripulirli dall'olio di cedro.

RIASSUNTO

Viene proposto di conservare i preparati schizomicetici distesi, fissati e colorati direttamente sul coprioggetto (« strisci »), proteggendoli con uno strato di acetilcellulosa (acetato di cellulosa) sciolta in acetone o acido acetico. Questa vernice, di rapida applicazione ed essiccamento lascia una pellicola molto aderente, sottile e trasparente, che non impedisce l'osservazione

coll'obbiettivo ad immersione e che, non essendo solubile in benzolo e in benzene, permette di nettare con questi solventi la superficie del vetrino da ogni traccia di olio di cedro senza danneggiare il preparato, assicurandone così una più lunga conservazione.

SUMMARY

It is proposed to preserve the microbic films with a coat of cellulose acetate dissolved in acetone or in acetic acid. This varnish, easily applied and rapidly dried up, leaves a very adherent, thin and transparent layer which doesn't hinder the observation through the oil-immersion objective.

Being cellulose acetate insoluble in benzol and petroleum spirit, its employ allows to wash the slide's surface by means of these solvents, without damaging the microbic film whose conservation gets therefore longer.

(Pervenuto in redazione il 30-6-47)

La degradazione della cellulosa nel terreno agrario

(Stato attuale delle nostre conoscenze ed esperienze personali)

Dott. Mario Formisano

Assistente

La cellulosa rappresenta il costituente fondamentale delle pareti delle cellule e dei tessuti vegetali.

Essa viene introdotta nel terreno sotto forme diverse: letame, sovescio, residui vari di vegetali, e, sottoposta all'azione di una abbondante e varia microflora e microfauna — batteri, funghi e protozoi (1) — subisce una degradazione molto marcata, specie ad opera della prima, entrando a far parte, come prodotto ultimo, della formazione dell'*humus*.

Sulla degradazione della cellulosa, polisaccaride molto complesso, vari sono gli studi eseguiti da diversi Autori; ma soprattutto i magistrali lavori del compianto Omeliansky (30) e massimamente gli studi di Winogradsky (51) sono giunti a risultati importantissimi in questo campo.

Secondo Omeliansky (30) possiamo, infatti, ritenere la degradazione della cellulosa legata particolarmente a due gruppi di batteri: gli aerobi e gli anaerobi; Winogradsky (51) ammette, però, che solo « le phénomènes aérobie est en cours sur toute la surface du sol, partout ou la matière végétale et le minimum d'humidité nécessaire ne font pas défaut dans ce milieu si parfaitement aéré ».

Anche i lavori di moltissimi altri Autori hanno portato un contributo elevatissimo su questo vasto e complesso problema che, in rapporto al numero ed alla varietà degli agenti attivi, oggi è assunto al rango dei più importanti dal punto di vista agrario.

DECOMPOSIZIONE DELLA CELLULOSA OPERATA DAI BATTERI AEROBICI

I primi lavori sull'argomento risalgono al 1904 colle esperienze di Van Itersen (42) che riusciva a mettere in evidenza una degradazione molto spinta della cellulosa, non solo in assenza di aria, ma anche e soprattutto in condizioni aerobiche.

(1) In questo lavoro prenderemo in considerazione soltanto gli schizomiceti senza entrare in merito all'azione che gli eumiceti in genere ed i protozoi possono svolgere sulla decomposizione della cellulosa.

L'azione degli eumiceti, soprattutto, è abbastanza manifesta, e le specie più attive sono da ascrivere ai seguenti generi: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Cephalosporium*, *Humicola*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus*, ecc.

L'Autore, infatti, coprendo della carta da filtro con granelli di terreno, notava dopo soli 4-5 giorni la presenza di macchie variamente colorate sulla carta, ed una lenta trasformazione della cellulosa, che finiva per ridursi in polpa. In ripetuti esami microscopici, tra una densa florula microbica, l'A. rinveniva particolarmente appariscente una forma batterica rapportabile ad un corto bastoncino, ed un cocco. Al primo egli assegnò il ruolo principale di degradatore della cellulosa, ed al secondo un'azione secondaria, quasi svolgesse un'attività simbiotica, perchè anch'esso era favorevole al processo. Il bastoncino fu definito più tardi col nome di *Bacterium ferrugineum* dallo stesso Van Iterson.

La questione venne ripresa nel 1911-12 da molti altri Autori, fra cui Merker (29), che isolò due specie di cocchi dalle foglie di *Elodea canadensis*, di cui il più attivo fu chiamato *Micrococcus cytophagus*; Kellerman (23), Mc Beth (24), e Smith (23) isolarono e descrissero circa 30 specie batteriche (*Bac. amylolyticus*, *cytaseus*, *galbus*, *bibulus*, *caesius*, *aurogenus*, *rossicus*, *cellaseus*, *subalbus*, *gelidus*, *Pseud. effusa*, *perlurida*, *subcreta*, ecc.) che, coltivate sui più svariati substrati nutritivi, formavano un alone periferico chiaro della grandezza variabile di 1-2 mm. Infatti, su agar preparato con soluzione minerale al 0,5 per mille di cellulosa precipitata e col 2 per mille di carbonato di calcio, si aveva sviluppo intenso di colonie batteriche, che si circondavano, dopo pochi giorni, del già citato alone di chiarificazione, con conseguente distruzione della cellulosa, mentre il carbonato di calcio veniva decomposto dagli acidi prodotti durante il processo degradativo. Mentre, però, alcuni autori avvaloravano le affermazioni di Kellerman e Mc Beth, Omeliansky (30) riteneva che il carbonato di calcio aggiunto al terreno nutritivo non venisse attaccato dagli acidi ottenuti dalla decomposizione della sostanza cellulosa, bensì dagli acidi derivanti dalla distruzione di altre sostanze organiche presenti nel terreno di coltura.

Nel 1915 Horowitz-Wlassowa (35) scopriva un nuovo degradatore della cellulosa e lo denominava *Bacillus cellulolyticus*, e molto più tardi (1935) isolava dal terreno due altri cellulolitici descrivendoli rispettivamente col nome di *Clostridium cellulosa*, e di *Bact. cellulolyticum flavum*.

Ma è nel 1919 che due studiosi inglesi, Hutchinson e Clayton (17), della Stazione Agraria di Rothamsted, potevano isolare e descrivere una tipica forma aerobica a cui davano il nome di *Spirochaeta Cytophaga*.

Poco più tardi Groenewege (13) (1920) - impiegando acqua di condotta col 2% di carta da filtro, 0,25% di nitrato potassico, 0,05% di bifsato di potassio - otteneva uno sviluppo molto intenso di gas mentre il nitrato veniva ridotto ad ossido di azoto e la carta risultava decomposta. Lo stesso autore isolava un gruppo di batteri aerobici e lo descriveva col nome di *Bacterium cellaresolvens* α , β , γ , colla proprietà specifica di attaccare la cellulosa solo in simbiosi con agenti denitrificanti. Anzi il Groenewege considerava questo processo degradativo legato ad un'attività enzimatica e batterica insieme. Infatti, l'A. riteneva che i batteri specifici degradatori della cellulosa, per opera della *cellulasi*, erano capaci di trasformare la cellulosa in *cellobiosio*, da questo la *cellobiasi* dava origine al glucosio che portava, infine, alla formazione di acido acetico, acido butirrico ed acido lattico.

Più tardi, ancora, Issatchenko (18) (1921) riuscì ad isolare due forme di cellulolitici denominati *Bact. cellulosaе album* e *Bact. cellulosaе flavum* dal limo di acque salse.

Nel 1922 Von Gescher (46), nel 1923 Barthel e Bengtsson (2) e nel 1924 Sack, Gray e Charners (39) continuarono gli studi sulla degradazione della cellulosa, ma anch'essi furono incompleti per le note difficoltà che s'incontrano nella separazione delle specie batteriche.

I due ultimi autori isolarono anche una specie nuova che descrissero col nome di *Microspira agar-liquefaciens*.

Chi, però, ha attirata l'attenzione dei batteriologi agrari sulla importanza di questo vasto problema è stato Winogradsky (51) (1925). Egli, infatti, prima di ogni altro, si è preoccupato di trovare un mezzo atto a facilitare lo sviluppo di queste forme batteriche in un ambiente il più che possibile scevro da inquinamenti estranei. Ha bandito, senz'altro, l'uso dei substrati liquidi, adatti solo per le culture di arricchimento in genere e per le esperienze quantitative, ed ha reso obbligatorio l'impiego delle piastre al silicogel, insemenate con granelli di terreno.

Infine, d'accordo con la tendenza che va sempre più accentuandosi in batteriologia, di raggruppare, cioè, le specie secondo la loro funzione ed *habitat*, ha proposto i tre generi *Cytophaga*, *Cellvibrio* e *Cellfalcicula* i quali - com'è noto - si differiscono per i seguenti principali caratteri:

Gen. Cytophaga. - Filamenti lunghi da 3 a 8 μ , sottili, acuminati, a volta flessuosi raramente spiralati, formanti coccoidi nell'invecchiamento delle culture, a funzione specifica e ad azione ossidante. Utilizzano soltanto cellulosa come sorgente idrocarbonata. Sul silico-gel-carta formano macchie variamente colorate in giallo-uovo, arancio-rosa, rosso-mattone. Le specie sono numerose; quelle studiate da Winogradsky sono: *Cytophaga Hutchin-soni*, *Cyt. aurantiaca*, *Cyt. rubra*, *Cyt. tenuissima*, che si distinguono fra loro per diversi caratteri: grandezza di filamenti, rapidità di fibrolisi, tinta delle colonie sul substrato-tipo, ecc.

Gen. Cellvibrio. - Forme a bastoncino di 2-5 μ , sottili, con estremi arrotondati, a volte ingrossati al centro, arcuati, quasi mai spiralati, dotati di una mobilità fortissima in grazia di un ciglio polare, ad azione ossidante e con fibrolisi mancante o talvolta tardiva. Sul silico-gel-carta macchie giallo-crema, ed ocracee. Le specie studiate e descritte da W. sono due: *Cellvibrio ochracea* e *Cellv. flavescens*.

Gen. Cellfalcicula. - Bastoncini fusiformi o falciformi di una lunghezza inferiore a 2 μ , con estremità appuntite, mobili, assenza di coccoidi, ad azione ossidante. Sul silico-gel-carta macchie verdi o caffè-latte o crema. Le specie sono numerose; di esse, tre sono state differenziate da W.: *Cellfalcicula viridis*, *Cellf. mucosa* e *Cellf. fusca*.

Winogradsky si è interessato, infine, dei caratteri chimici dei cellulolitici aerobici ed ha stabilito che:

la cellulosa fibrosa si ossida ad ossicellulosa, sostanza questa, dispersibile nell'acqua, solubile negli alcali deboli, precipitabile con gli acidi, senza possedere, però, alcun potere riduttore.

Il processo non si compie che in presenza di azoto assimilabile, inorganico di preferenza, che passa allo stato di azoto organico al tasso di circa 2% della cellulosa scomparsa e lo sviluppo microbico è regolare solo se il pH iniziale è superiore a 7;

non vi è produzione di acidi grassi, nè generalmente di prodotti volatili.

Contemporaneamente agli studi di Winogradsky, Bojanowsky (3) (1925), insemmando il gel ricoperto da un sottile strato di cellulosa fibrosa con granelli di terreno, metteva in evidenza la *Spirochaeta Cytophaga* di Hutchinson e Clayton.

Dal 1926 al 1929, Waksman (47), presso la Stazione Sp. di New Jersey, compiva numerose ricerche sulla decomposizione microbiologica della cellulosa.

La costituzione chimica dei tessuti delle piante e l'aggiunta di azoto o di una rilevante quantità di acqua al terreno aveva, secondo Waksman, anche una certa influenza sul grado di decomposizione delle sostanze cellulosiche.

Nel 1928 R.J. Dubos (8) riteneva che il processo in parola fosse legato a funghi filamentosi in genere, ma l'attacco della cellulosa risultava tanto più rapido quanto più elevato era il numero dei batteri presenti nel suolo, specie se quest'ultimo presentava una reazione pressochè neutra.

Nel 1929 Arnaudi (1) affermava che « il terreno è tanto più fertile quanto maggiore è il numero di cellulolitici aerobî in esso presenti » ed i terreni privi o scarsi di detti microrganismi si presentano inadatti alle coltivazioni più varie.

Nel 1930, lo stesso autore, eseguendo delle ricerche sulla flora microbica dei terreni della brughiera lombarda, notava la presenza di microrganismi ascrivibili ai generi *Cytophaga* e *Cellvibrio*, però il numero era abbastanza scarso, come risulta dai dieci campioni da lui esaminati, per cui concludeva il suo lavoro ammettendo che i terreni non concimati presentavano solo delle scarse forme di *Cellfalcicula*; i terreni concimati con sostanze minerali permettevano lo sviluppo di alcune specie riferentisi al genere *Cellvibrio*; e nei soli terreni abbondantemente e costantemente concimati con stallatico si aveva una marcata decomposizione della cellulosa ad opera della *Cytophaga*. Successivamente (1931), lo stesso Arnaudi (1), continuando gli studi sulla decomposizione della cellulosa nei terreni della brughiera lombarda (questa volta, però, lautamente concimati con stallatico) e notando in essi uno sviluppo marcato di cellulolitici aerobici, fu spinto a ricercare le stesse forme nelle feci sia equine che bovine.

Si preoccupò, allora, di stabilire se eventualmente i degradatori della cellulosa potessero esplicare qualche azione sulla digestione degli animali (dato che i ruminanti in ispecie introducono una grande quantità di cellulosa nel loro corpo e la rigeriscono per circa il 60% [Haubner]), ed, infatti, in numerose esperienze eseguite sulle diverse parti dell'apparato digerente dei bovini, poteva constatare la presenza di cellulolitici nel rumine, secondo e terzo stomaco e nel cieco; assenza di sviluppo nel quarto stomaco, sebbene i risultati fossero alquanto differenti nelle vacche.

Cercando, allora, l'A., donde provenissero questi degradatori della cellulosa, in assaggi d'orientamento sulla paglia e sul fieno, vi rinveniva i microrganismi di Winogradsky, principalmente la *Cytophaga Hutchinsoni* e diversi *Cellvibrio*.

Ancora, nel 1930, Kalnins (33) metteva in evidenza una degradazione molto spinta della cellulosa ad opera delle specie di Kellerman, Gray e Chalmers ed Hutchinson e Clayton e nello stesso tempo, adoperando delle piastre agarizzate secondo il metodo Kellerman, isolava una serie di specie nuove con caratteri specifici di degradatori aerobici, e quasi contemporaneamente Bokor isolava un microrganismo col nome di *Mycococcus cytophagus*.

E' dal 1931 che l'Istituto di Microbiologia Agraria della Università di Napoli si è occupato di questo interessante problema. Infatti Riccardo (35) metteva in evidenza le forme già descritte, massimamente quelle riferentisi al genere *Cytophaga*, nei terreni di orto, sottoposti a concimazione organica e in quelli del parco Gussone annesso alla Facoltà, e mediante un dispositivo basato sul principio di permettere alla soluzione circolante nel terreno di passare per capillarità in un substrato sterile ed a formula elettiva per determinati microrganismi, otteneva delle culture di arricchimento di *Cytophaga*.

Nel 1933 Castelli (4), su parcelle dell'Orto Botanico della Facoltà di Agraria di Perugia e su terreni di campi coltivati a grano, trovava molto frequentemente la *Cytophaga* ed i *Vibrioni*, ed in una rassegna sulla diffusione dei cellulolitici aerobici nelle terre italiane, in 115 campioni provenienti dalle più disparate località, egli poteva dimostrare la grande diffusione di questi microrganismi, che risultarono assenti in 9 campioni soltanto.

Riguardo alla natura del terreno, lo stesso Autore osservava che in quelli argillosi la *Cytophaga Hutchinsoni* era presente nel 57,5%, in quelli di medio impasto nel 62,6% ed in quelli sabbiosi nel 66,6%; mentre il *Cellvibrio flavescens* era presente rispettivamente nella proporzione del 47,5%; 51%; e 62,5%; e, cercando di stabilire se i cellulolitici avessero dei rapporti con gli azotobatteri (dato che Makrinoff e Troitzsky avevano creduto di poter attribuire dei rapporti simbiotici nelle loro attività pedologiche) concludeva che lo sviluppo dei primi non ha alcun rapporto con la presenza e l'abbondanza dei secondi; isolava, infine, l'A., una specie nuova di cellvibrione descrivendola col nome di *Cellvibrio violacea*.

Contemporaneamente, Verona (44), (1933) rinveniva forme di cellulolitici aerobici massimamente riferentisi alla *Cytophaga Hutchinsoni* e alla *Cytophaga rubra* nei terreni salini del litorale toscano (concentrazione salina 0,145-5,096 di Na Cl); e nel 1934, adoperando delle piastre al silico-gel-carta, lasciate aperte 1-2 giorni in una stanza a 15°-16° C., indi, conservate, previa copertura, in termostato a 24° C. poteva seguire lo sviluppo spontaneo dei microrganismi degradatori della cellulosa, sviluppo che si presentava più o meno abbondante già dopo 24-48 ore.

Accanto alle forme di Winogradsky, Verona osservava il propagarsi di una colonia piuttosto rotondeggiante, rilevata, mucosa, brillante, jalina, che differenziandosi dalle altre specie già note per caratteri morfo-biologici, veniva descritta col nome di *Cytophaga Winogradski*. In successivi lavori

l'A. metteva in evidenza dei cellulotici nell'apparato digerente delle termiti.

Infine Perotti e Verona (34) (1933) studiando la microflora dei suoli situati nei Paesi freddi ad elevata latitudine accertavano la presenza, in alcuni campioni prelevati negli Spitzbergen occidentali (Baia di Tempio, Longyear City, Baia della Maddalena), di forme aerobiche di cellulotici del gruppo *Cytophaga*, e successivamente descrivevano due nuove specie di Cellvibrioni col nome di *Cellvibrio rosea* e *Cellv. minuscola*.

Più tardi, Jadwiga Marszewska-Ziemiańska (21), eseguendo degli studi sulla decomposizione della sostanza organica nel suolo notava come questa sostanza venisse attaccata prima dai batteri specifici (comprendendo in essi anche i degradatori della cellulosa) e poi dagli Attinomiceti che agivano solo in un secondo tempo cioè in uno stadio più avanzato di umificazione.

Nel 1935, venivano condotte alcune esperienze da Halina Felsz-Karnicka (15) su terreni acidi della Polonia, prelevati particolarmente da un campo della Stazione Agronomica di Sobieszyn, poggiante su di un suolo podsolico, povero di *humus* e a reazione eminentemente acida (pH 4,0-6,0).

L'A. si serviva, per le culture, delle già note piastre di Winogradsky e di altri substrati speciali e dall'esame di 19 campioni deduceva che nei terreni acidi la quantità di muffe superava di gran lunga gli attinomiceti mentre i batteri erano pressochè assenti, e solo nei terreni più saturi di basi, i batteri avevano un evidentissimo sviluppo ed erano i soli a compiere il processo di degradazione della cellulosa. Fra questi ultimi ben 13 specie venivano isolate e descritte: *Chaetomium spirale*, *Chaetomium kunzeanum*, *Chaetomium indicum*, *Chaetomium sp.* fra gli Ascomiceti; *Mycogone puccinoides*, *Papulopsora nigra*, *Oedocephalum glomerulosum*, *Trichoderma lignorum*, *Stachybotrys lobulata*, *Dicoccum asperum*, *Botrytis* (specie indefinita), *Blastotrichum* (specie indefinita), *Chaetophoma sp.* ed un Fungo anch'esso indefinito, tra i funghi imperfetti.

Precedentemente, Stapp e Bortels (35) (1934), dopo l'esame di numerosi terreni isolavano e descrivevano due cellvibrioni col nome di *Cellvibrio fulva* e *Cellvibrio vulgaris*, nonchè altre citofaghe definendole rispettivamente: *Cytophaga globulosa*, *Cytophaga silvestris*, *Cytophaga anularis*, *Cytophaga crocea*, *Cytophaga flavicula*.

Nel 1938 Vandecaveye e Katznelson (43) in una duplice serie di esperienze condotte su terreni fortemente concimati con residui organici provenienti da Palouse e da Helmer, mettevano in evidenza una degradazione abbastanza marcata della cellulosa dovuta nei primi a funghi in genere ed a batteri aerobici, nei secondi a batteri aerobici e ad attinomiceti.

Jensen (22), da 56 terreni danesi di differente natura, in cui il numero di Attinomiceti variava da zero o poche migliaia fino a 13 milioni per gr. di terra, isolava e descriveva molte specie, fra cui: *Actinomyces griseus*, *cellulosae*, *olivaceus*, *griseoflavus*, *violaceus*, *ruber*, *roseus*, *fulvissimus*, ecc. con caratteri fisiologici (produzione di pigmenti, capacità di utilizzare diversi carboidrati, formazione di acido, attività proteolitica, riduzione di nitrati, ecc.) talvolta molto differenti tanto da mettere in dubbio se assegnare una specie ad un gruppo piuttosto che ad un altro.

Nel 1939 Otani (31) descriveva una *Pseudomonas fibrolysis* come nuova specie aerobica degradatrice della cellulosa.

Nell'ambito, poi, degli schizomiceti cellulolitici aerobici, sono da ascrivere anche forme termofili. Infatti, i primi autori che si occuparono di questo gruppo furono Mac Fadjen e Blaxall (35) i quali eseguirono le loro ricerche con brodi vari addizionati di carta da filtro ed insemnati con granelli di terreno notando un accentuato sviluppo di ciclo acetico, butirrico, ecc. come indice della attiva fermentazione prodotta, e conseguente distruzione della cellulosa. Più tardi il processo fu estesamente considerato da Kroulik, Viljoen e collaboratori (45), i quali ultimi descrissero una nuova specie col nome di *Clostridium thermocellulosae*, capace di svilupparsi anche in agar.

Ed ancora A. Itano e S. Arakawa (20) isolavano dal letame stallatico uno schizomicete aerobico termofilo e lo descrivevano col nome di *Bacillus thermofibrincolus*; Dunez (9) isolava quattro specie, non ancora definite, dalla paglia in decomposizione; Guittonneau (14) il *Thermobacillus Tarbellicus* e Coolhaas (7) il *Bacillus thermocellosolyticus*, incapace, però, di attaccare la cellulosa in coltura pura.

Recentemente Riccardo (35), studiando la microflora terricola insediata sulle lave vesuviane del 1895-99, ha potuto constatare che i cellulolitici aerobici erano scarsissimi. Infatti, anche dopo ben quattro mesi di interrimento dell'apparecchio da lui ideato, contenente delle listerelle di carta, non si aveva alcuna apparizione di macchie colorate, stando così ad indicare che il grado del potere decomponente del terreno sulla cellulosa (« Cifagometria ») era negativo.

AZIONE DEI MIXOBATTERI SULLA DEGRADAZIONE DELLA CELLULOSA

Stenier (40), per primo, si è interessato di questo gruppo descrivendo nuove specie col nome di *Vibrio Beijerinckii*, *Vibrio fuscus*, *Pseudomonas iridescens*, *Cytophaga diffluens*, *Cytophaga Krzemieniewskyi*, ed ha proposto di attribuire le citofaghe formanti microcisti alla famiglia delle *Mixococcaceae*, e tutte le altre alla famiglia delle *Cytophagaceae*, fondandosi sul fatto, confermato più tardi da Krzemieniewska (26), di notare dopo solo 48 ore delle formazioni globulari, riprodotte attivamente in modo da invadere in breve tempo tutte le fibre attaccate. Erano queste delle vere e proprie cisti che dopo 2 o 3 ore permettevano la fuoriuscita di un bastoncino, mentre esse subivano un lento dissolvimento fino a scomparire del tutto. Ma Stenier dimostrò pure che non è la cellulosa l'unica sostanza idrocarbonata capace di essere attaccata e spappolata, poichè sia l'agar che alcuni idrati di carbonio possono con facilità essere degradati.

H. Krzemieniewska (26) ha portato un forte contributo sulle caratteristiche morfo-citologiche dei degradatori della cellulosa, ed ha descritto pure una nuova forma col nome di *Cytophaga myxococcoides*, caratterizzata da un pigmento giallo, che si allontana però dalla *Cytophaga aurantiaca* di Winogradsky perchè ha la proprietà di formare microcisti dopo 48 ore dall'inizio della cultura.

E più tardi, lo stesso autore, in collaborazione con S. Krzemieniewski ha isolato dei mixobatteri servendosi di feci di coniglio sterilizzate e poste

a contatto col terreno. Le specie nuove sono state descritte col nome di *Sorangium compositum*, e *Sorangium nigrescens* con la proprietà di svilupparsi anche a spese di zuccheri, come il glucosio, che aggiunto nella percentuale di 300 mgr. per piastra di silico-gel determina uno sviluppo abbondante delle due forme aerobiche, ma attenua l'attacco alle fibre di cellulosa, e solo una diminuzione della dose di zucchero ripristina la degradazione cellulosa.

Imsenecki e Solntzewa (19) hanno descritto due altri mixobatteri: *Polyangium cellulosa* e *Sorangium cellulorum*, quest'ultimo isolato dalla torba e sviluppatosi attivamente su agar-amido.

Mischiustin (32) ha isolato quattro varietà nuove di *Polyangium cellulosa* e le ha descritte rispettivamente col nome di *Polyangium cellulosa* varietà *fuscum*, *ferrugineum*, *fulvum* e *luteum*.

Riccardo (35), però, in una rassegna critica, ha richiamato l'attenzione degli studiosi su importanti questioni, e propriamente sul fatto che molte specie oggi descritte come nuove sono probabilmente delle miscele di due microrganismi, come sembra ad esempio il *Mycococcus cytophagus* di Borror (insieme di una forma di *Cytophaga* e di un Attinomicete); e che la proprietà che hanno i batteri aerobici di svilupparsi a spese degli zuccheri, delle destrine, dell'amido, e ritenuti come attivi degradatori della cellulosa « non è una ragione per collocare tali microrganismi nello stesso gruppo degli *agenti specifici* della degradazione della cellulosa i quali non solo rifiutano gli zuccheri, ma spiegano verso di essi una intolleranza estrema, soprattutto se si tratta di zuccheri riduttori ».

« Mentre, quindi, oggi è ormai accertata l'azione specifica dei gruppi del Winogradsky - continua l'A. - non così e per altri come i bacilli del Simola: *Bac. mixogenes* e *Bac. mucosus* che pare abbiano un'azione anche sulla cellulosa, ma è questa una attività secondaria e che non può autorizzare a considerare il microrganismo come agente cellulolitico in natura ».

ESPERIENZE ESEGUITE IN LABORATORIO

I campioni di terreno esaminati sono stati i seguenti:

A) Terreno prelevato nella zona di Poggiomarino in un appezzamento arborato, precedentemente concimato con sovescio di leguminose.

B) Terreno di orto ben concimato con stallatico della zona di Scafati, raccolto a piè d'un noce.

C) Terreno prelevato dalla sponda destra del fiume Sarno unitamente ad una piantina di graminacea spontanea.

D) Terreno coltivato a garofani nella zona di Torre del Greco e così preparato: tre parti di terriccio di bosco venivano mescolate con una parte di terra comune ed una di sabbia marina abbondantemente dilavata con acqua corrente; il tutto coperto con stallatico e spazzatura ed innaffiato con cessino diluito.

E) Terreno raccolto a sud-est dell'Osservatorio Vesuviano a piè di una piccola pianta di fico nata spontaneamente su detriti di lava antica.

F) Terreno dell'Orto Botanico della Facoltà di Agraria di Portici, convenientemente concimato con stallatico.

Sono state, inoltre, esaminate: G) Feci di coniglio.

H) Feci di cavallo.

I) Feci fresche di bovino.

L) Feci mature di bovino.

Con ogni campione si allestiva una sene di piastre preparate nel seguente modo:

Si inumidiva il materiale in esame, si spargeva in superficie un po' di nitrato potassico polverizzato e si copriva il tutto con carta da filtro tagliata a disco. A parte si allestivano per ciascun campione le piastre controllo, prive di nitrato potassico.

Periodicamente le piastre venivano sottoposte ad osservazioni macro e microscopiche; osservazioni che si possono così raggruppare:

Campione A.

Dopo 3-4 giorni si aveva la comparsa delle prime macchie colorate in giallo-oro che invadevano tutta la superficie della carta provocandone la dissoluzione dopo 30-35 giorni con formazione di ossicellulosa, che si poneva in evidenza col noto metodo di Winogradsky al bleu di metilene.

Sulla piastra controllo macchie colorate in giallo ed in arancione comparivano dopo 6-7 giorni.

Alcune delle prime piastre furono invase, però, ben presto, da eumiceti del genere *Trichoderma*, e furono quindi scartate.

Dopo un mese si procedeva ai trapianti in piastre preparate come appresso e contenenti ciascuna un disco di carta da filtro:

Sabbia bianca	gr. 100,00
Carbonato di calcio	» 26,00
Carbonato di magnesio	» 4,00
Argilla bianca	» 16,00
Nitrato potassico	» 0,40
Soluzione A di Winogradsky (1)	» 8,00
Acqua distillata	» 44,00

Dopo 5 giorni si notavano grosse macchie giallastre che, dapprima isolate e sparse, invasero in breve tempo tutta la carta; dopo 20 giorni le piastre si ricoprivano di un gel mucoso caratteristico e di color madreperlaceo.

Alle osservazioni microscopiche si metteva in evidenza quanto segue: le macchie gallo-oro, giallastre ed arancione erano ricche di citofaghe, massimamente riferentisi alla *Cytophaga aurantiaca* W.; quelle madreperlacee

(1) La soluzione A di Winogradsky ha la seguente composizione: Acqua distillata gr. 100; fosfato monopotassico gr. 0,50; solfato di magnesio gr. 0,25; cloruro di sodio gr. 0,25; solfato di ferro gr. 0,005; solfato di manganese gr. 0,005.

erano ricche di cellvibrioni e di forme ascrivibili ai cosiddetti « fuseaux verts » di Winogradsky. In alcune piastre si notò un accentuato sviluppo di protozoi e di piccoli acari.

Campione B.

Dopo 10 giorni si ebbero sulle piastre delle macchie color crema e dopo 20 giorni una colorazione rosso-mattone.

Sulla piastra controllo lo sviluppo procedeva molto più lentamente tanto che dopo 15 giorni non si notava ancora alcuna maculazione sulla carta da filtro.

In seguito si allestì una nuova serie di piastre facendo a questa subire lo stesso trattamento già seguito per il primo campione. Dopo 20 giorni circa apparivano delle macchie giallognole e dopo un mese la carta era completamente colorata; la fibrolisi fu però molto tardiva e poco appariscente.

L'esame microscopico mise in chiaro i seguenti fatti:

1) La fibra spapolata presentava un accentuato sviluppo di citofaghe e di cellfalcicule;

2) non mancavano anche forme di cellvibrioni; ma in numero esiguo;

3) pressochè assente era lo sviluppo di eumiceti e di protozoi.

Campione C.

Con questo terreno si allestiva una doppia serie di piastre, che contenevano il già ricordato substrato nutritivo.

La prima serie veniva insemata con granuli di terreno, la seconda con frammenti di radichette di una graminacea spontanea che venne raccolta all'atto del prelevamento del campione.

Dopo 6-7 giorni, si ebbero delle macchie gialle ed ocre sulla carta delle piastre facenti parte della prima serie. Più tardiva invece fu la colorazione delle piastre insemate con frammenti di graminacea, (infatti solo dopo 10-12 giorni comparvero delle macchie color marrone).

Le piastre controllo ebbero assenza di sviluppo fino al 15° giorno.

Si seguirono, più tardi, delle culture di propagazione, e la fibrolisi in esse fu generalmente più intensa. Infatti sulle piastre della prima serie la fibrolisi fu completa dopo 20 giorni, su quelle della seconda serie dopo 26 giorni.

All'osservazione microscopica si notò che lo sviluppo di citofaghe era più marcato nelle piastre insemate con radichetta di graminacea e le specie costantemente trovate potevano ascrivere alla *Cytophaga aurantiaca* W.; meno accentuato era invece nelle altre; erano presenti anche protozoi ed anguillulidi.

Campione D.

La colorazione della carta da filtro è tipicamente ocrea già dopo 15 giorni e la fibrolisi è pressochè completa dopo 40 giorni. Quasi parallela è l'azione ossidante e fibrolitica sulla piastra controllo.

Al microscopio appare molto accentuato lo sviluppo dei cellvibrioni rapportabili a *Cellvibrio ochracea*. Alquanto limitato è invece lo sviluppo delle citofaghe e di altri cellulolitici; assenti i protozoi.

Campione E.

Dopo circa un mese dalla cultura, apparivano le prime macchie gialle e rosa.

La carta della piastra-controllo non era stata ancora attaccata. Dopo 50 giorni si eseguì un trapianto su nuove scatole Petri. L'eccessiva invadenza di eumiceti non permise più sviluppo alcuno di cellulolitici per cui le piastre furono abbandonate.

La piastra controllo invece dette delle belle colorazioni giallo intenso. L'esame microscopico su quest'ultima stabilì la presenza limitata di citofaghe, in specie *l'aurantiaca*; i cellvibrioni furono scarsissimi e le cellfalcicule completamente assenti, così pure ogni altra forma d'inquinamento.

Campione F.

Il terreno prelevato fu disposto in grosse scatole ed innaffiate con *soluzione A di Winogradsky*.

La piastra controllo non subiva questo trattamento. L'azione fibrolitica si manifestò abbastanza marcata, dopo 7-8 giorni, infatti, si presentarono abbondanti macchie di color rosso-vinoso intenso.

Dopo un mese si fecero dei trapianti su nuove piastre, ma lo sviluppo su quest'ultime fu piuttosto lento e la carta si colorò soltanto dopo circa 40 giorni dopo la propagazione, mentre la fibrolisi fu pressochè assente.

La carta della piastra-controllo si colorò invece molto intensamente e diffusamente dopo 15-16 giorni ma, dopo circa un mese, si ebbe un abbondante sviluppo di insetti: *fam. Bibionidae; gen. Scatobx*.

Le osservazioni microscopiche confermarono la presenza di citofaghe, però in numero abbastanza ridotte; più abbondanti erano, invece, i cellvibrioni.

Campione G.

Si stabilirono tre gruppi di 5 piastre ciascuno. In quest'ultime, aventi il già citato substrato nutritivo, si seguì il metodo della diluizione.

La piastra controllo fu insemata, invece, con un granulo fecale semplicemente spappolato.

Dopo 12, 16 e 22 giorni rispettivamente si ebbe la comparsa di macchie color rosa e rosso-mattone sulla triplice serie di piastre. Le scatole Petri del primo gruppo in breve tempo furono invase da eumiceti, così pure la piastra-controllo; le rimanenti, invece, dopo 30 e 40 giorni, rispettivamente, avevano subite la fibrolisi.

Si seguì, in seguito, il trapianto, su nuove piastre, con fibra spappolata e la colorazione della carta si ripetette quasi integralmente.

Le osservazioni al microscopio misero in evidenza la presenza di citofaghe (*Cytophaga Hutchinsoni* e *Cytophaga rubra W.*) e di protozoi.

Campione H.

Dopo 10-12 giorni dall'inseminazione cominciarono a comparire le prime macchie di color giallo-uovo molto tenui sia nelle piastre contenenti nitrato potassico che su quella controllo.

Il distendersi delle zone colorate procedette abbastanza lentamente per

cui si credette che ogni attività microbica si fosse arrestata. Fu però dopo circa 40 giorni che la degradazione riprese, e questa fu così rapida che dopo altri 5 giorni la carta veniva completamente trasformata in polpa.

Eseguido una prima osservazione microscopica si ebbe a constatare la sola presenza di protozoi e di qualche anguillulide.

In successive osservazioni, però, e propriamente quando la carta si presentava interamente spappolata si notavano delle forme ascrivibili a *Cytophaga aurantiaca* e *Cellvibrio ochracea* W.

Campione I.

Nella prima decade di osservazione lo sviluppo era assente, ma dopo 18-19 giorni incominciarono a comparire le prime macchie color giallo, rosa, rosso-mattone che divennero molto evidenti dopo un mese circa.

La carta della piastra-controllo, invece, s'era già colorata dopo 10-12 giorni.

Più tardi con materiale prelevato in diversi punti si allestirono nuove piastre, sulle quali si ripetettero gli stessi caratteri delle precedenti. Solo in due piastre si accentuò lo sviluppo di eumiceti e di acari e la fibrolisi fu molto tardiva. Al microscopio si osservarono forme di *Cytophaga* e di altri microrganismi nonché un numero discreto di protozoi.

Campione L.

Si allestirono delle piastre con le note modalità dette innanzi. Dopo 13 giorni la carta era ancora intatta anche nella piastra-controllo, e si aveva assenza completa di macchie colorate. Solo dopo circa 18-20 giorni incominciarono a comparire delle colorazioni giallastre. L'invasione delle muffe, però, contribuì in seguito ad arrestare l'ulteriore sviluppo dei cellulolitici.

Osservando al microscopio la cellulosa decomposta si notavano fra le ife fungine delle cellule attribuibili alle citofaghe.

L'azione era sempre ossidante e questa si rivelava con la già citata prova del bagno di metilene (che fu eseguita in genere per tutti i campioni).

La fibrolisi era assente.

Nella seguente tabella, vengono riportati i principali caratteri osservati:

Campioni esaminati	Citofaghe	Cellvibrioni	Cellfalcicole	Protozoi	Fibrolisi	Azione ossidante colla prova del bagno del bleu di metilene
A	(++)	(++)	(-)	(+)	intensa	Positiva
B	(++)	(±)	(++)	(±)	molto tardiva	Poco apprezz.
C	(++)	(-)	(-)	(+)	intensa	Positiva
D	(±)	(+++)	(±)	(-)	intensa	Positiva
E	(±)	(±)	(-)	(-)	molto tardiva	Poco apprezz.
F	(±)	(++)	(-)	(-)	molto tardiva	Poco apprezz.
G	(+)	(-)	(-)	(+)	tardiva	Positiva
H	(+)	(+)	(-)	(+)	intensa	Positiva
I	(++)	(-)	(-)	(+)	tardiva	Positiva
L	(±)	(-)	(-)	(-)	assente	Poco apprezz.

Nota. — I segni (+), (++) , (+++) stanno ad indicare in ordine crescente la presenza dei cellulolitici.

Il segno (+) indica sviluppo limitato, o comunque scarso.

Il segno (-) indica assenza di sviluppo.

CONCLUSIONI

Le esperienze da me compiute finora sulla degradazione aerobica della cellulosa fanno stabilire quanto segue:

1) La cellulosa subisce nel terreno agrario una degradazione molto spinta ad opera dei cellulolitici anobici.

2) Le specie più frequentemente riscontrate sono da attribuire alla *Cytophaga aurantiaca* di Winogradsky. Presenti sono pure le specie riferentisi ai generi *Cellvibrio* e *Cellfalcicula*, ma in misura ridotta rispetto a quelle del genere *Cytophaga*. Il fatto che in un campione (D) si sia avuto un accentuato sviluppo di cellvibrioni (*Cellvibrio ochracea* W.), oltre alle citofaghe, induce a pensare che ciò sia dovuto all'impiego di abbondante concime organico a base di stallatico e di spazzature per rendere più adatto il terreno alla floricoltura.

3) Il numero dei cellulolitici tende ad aumentare con l'apporto di concimi organici al terreno.

4) Oltre alle citofaghe, ai cellvibrioni ed alle cellfalcicule, non si esclude che i protozoi possano spiegare un'azione non indifferente nel processo della degradazione della cellulosa.

RIASSUNTO

L'A., dopo aver passato in rassegna i lavori compiuti dal 1904 ad oggi e messa in risalto tutta l'importanza che ha la degradazione della cellulosa nel terreno ad opera dei microrganismi aerobici, dà conto dei risultati ottenuti sperimentando su campioni di terreni vesuviani, di orto e di escrementi di mammiferi, nei quali ha potuto riscontrare un accentuato sviluppo di Citofaghe e di Cellvibrioni, specie nei terreni ricchi di concimazioni organiche a base di stallatico.

SUMMARY

The Author, after a brief exposition of the works made from 1904 until to-day and after having apologized the great importance of the degradation of the cellulose in the soil by aerobic microorganisms, presents some resultats obtained by experiments on some samples of Vesuvian soils, kitchen-garden and excrements of mammifers, in which he could observe a marked development of Cytophages and Cellvibrions, particularly in the soils rich of organic manures composed especially by stabling.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Arnaudi C., *Recherches sur la dégradation aérobie de la cellulose par les microorganismes du groupe « Cytophaga », dans les terrains de la Bruyère lombarde*. Estr. I Congrès Intern. Microb. Paris, 1930.
— *La présence dans le rumen des bovidés de microorganismes dégradants la cellulose, du groupe « Cytophaga »*. Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microb., fasc. II, 1931.
- 2) Barthel Ch. e Bengtsson N., *Bidrag till fragen om stallgödselns virkningsätt vid cellulosasönderdelningen i akerjorden*. Meddl. n. 248, 1923.
- 3) Bojanovsky R., *Zweckmäßige Neuerungen für die Herstellung eines Kieselsäure-Nährbodens und einige Beiträge zur Physiologie aërober Zelluloselöser*. Centr. Bakt. 2 Abt., 64, 1925.

- 4) Castelli T., *Ricerche sulla diffusione degli schizomiceti aerobi degradatori della cellulosa nei terreni italiani*. Portici, 1933.
- 5) Charpentier C., *Studien über den Einfluss des Rindvich und Pferdestallmistes auf die Zersetzung der Zellulose in der Ackererde*. Thesis, Helsingfors, 1921.
- 6) Christensen H., *Ein Verfahren zur Bestimmung der zellulosezersetzenden Fähigkeit des Erdbodens*. Centr. Bakt. 2, Abt., 27, 1910.
- 7) Coolhaas, citato da Riccardo.
- 8) Dubos R. J., *The Decomposition of Cellulose by Aerobic Bacteria*. Estr. Journ. Bact. v. 15, n. 4, 1928.
- 9) Dunez, citato da Riccardo.
- 10) Fuller J. E., *The influence of Legume Versus Non-legume Crops on the Microbiological Activities in the Soil: II Nitrification and Cellulose Decomposition*. « Soil Science », v. 35, n. 6, 1933.
- 11) Giordani M., *Studi sull'estrazione della cellulosa a mezzo del cloro*. Estr. Boll. Sc. Natural. Napoli, 1924.
- 12) Gray e Chalmers, citati da Winogradsky.
- 13) Groenewege J., *Untersuchungen über die Zersetzung der Zellulose durch aërobe Bakterien*. Centr. f. Bakt., Abt. II, Band. 53, 1921.
- 14) Guittonneau, citato da Riccardo.
- 15) Halina Felsz-Karnika, *Rozklad cellulozy w glebach Kwasnych (Przyczynki charakterystyki mikrobiologicznej gleb Rolniczego Zakland Doswiadczalnego w Sobieszynie)*, 1935.
- 16) Hiltner L. and Stormer K., *Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache*. Arb. Biol. Abt. 3, 1903.
- 17) Hutchinson H. B. and Clayton J., *On the Decomposition of Cellulose by an aerobic organisms (Spirochaeta cytophaga)*. Journ. Agric. Scien. 9, 1919.
- 18) Issatchenko, citato da Perotti.
- 19) Imsenecki e Solntzewa, citati da Riccardo.
- 20) Itano e Arakawa, citati da Riccardo.
- 21) Jadwiga Marszewska-Ziemięcka, *Nowe sposoby badania mikroorganizmów rozkładających w glebie substancje organiczne*. Poznan, 1934.
- 22) Jensen J., *Journal of Agricultural Science*, vol. 21, 1931.
- 23) Kellermann K. F., Mc Beth S. G., Scales F. M. and Smith W. K., *Identification and Classification of Cellulose Dissolving Bacteria*. Centr. f. Bakt. II Abt., 1913.
- 24) Kellermann K. J. and Mc Beth S. G., *The Fermentation of Cellulose*. Centr. f. Bakt. II, 34, 1912.
- 25) Koffman M., *De Egentliga Jordprotozoerna (Deras ställing till andra Jordmikroorganismer och deras roll vid de Mikrobiologiska processerna i jorden)*. Stockholm, 1931.
- 26) Krzemieniewska, citato da Riccardo.
- 27) Löhnis F. and Smith N. A., *Life cycles of the bacteria*. Journ. Agr. Res., vol. 6, n. 18, 1916.
- 28) Mc Beth S. G., Scales F. M. and Smith W. K., *Characterisation of Cellulose destroying Bacteria*. Centr. f. Bakt. Abt. II, 1914.
- 29) Merker E., *Parasitische Bakterien auf Blättern von Elodea*. Centr. f. Bakt. II Abt., Band 31, 1911.
- 30) Omeliansky V., *Sur la fermentation de la Cellulose*. Comp. Rend. Acc. Scien. 1895, 1897.
- 31) Otani, citato da Perotti.
- 32) Mischiustin, citato da Riccardo.
- 33) Perotti R., *Biologia vegetale applicata alla Agricoltura. II Batteriologia*. Torino, 1943.
- 34) Perotti R. e Verona O., *Reperti batteriologici su di alcuni terreni degli Spitzbergen occidentali*. Boll. Ist. Sup. Agrario, Pisa, 1933.
- 35) Riccardo S., *Le streptotricce dal punto di vista agrario (Rivista critica)*. Portici, 1923.
 - *Dispositivi per ottenere in pieno campo culture elettive della Microflora terricola*. Soc. Tip. Mod., 1927.
 - *Sulla degradazione microbiologica della cellulosa*. Estr. Ann. R. Istituto Sup. Agrario. Portici. Serie III, vol. 5, 1931.
 - *La distruzione della cellulosa nel terreno agrario e la « Cytophaga » del Winogradsky*. Estr. Atti Rad. Tec. Agr. del Mezzogiorno e Isole d'Italia, 1931.
 - *L'azione di microbi alcali tolleranti nella preparazione di paste cellulosiche*. Estr. Ann. Fac. Agr. Portici. Serie III, vol. 10, 1939.

- *Lo studio della microflora terricola insediatasi sulle lave vesuviane del 1895-99 (Primo contributo)*. Estr. Ann. Fac. Agr. Portici. Serie III, vol. 13, 1941.
- *I microrganismi che presidono ai principali processi della fertilità del terreno agrario*. Portici, 1943.
- 36) Rossi G., *La preparazione microbiologica della cellulosa*. «Zimologica». Anno II, n. 1, 1926.
- 37) Russell J. and Others, *The Micro-organisms of the Soil*, 1923.
- 38) Russell E. J. and Hutchinson H. B., *The effect of partial Sterilization of Soil on the production of plant-food*. Journ. Agr. Scien., n. 3, 1909.
- 39) Sack J., *Zellulose angreifende Bakterien*. Centr. f. Bakt. II Abt, n. 5, 1924.
- 40) Stenier, citato da Riccardo.
- 41) Tenney F. G. and Waksman S. A., *Composition of Natural Organic Materials and Their Decomposition in the Soil: V. Decomposition of Various Chemical Constituents in Plant Materials, under Anaerobic Conditions*. «Soil Scien.», vol. 30, n. 2, 1930.
- 42) Van Iterson C., *Die Zersetzung von Cellulose durch aërobe Mikroorganismen*. Centr. f. Bakt. II Abt., n. 23, 1904.
- 43) Vandecaveye S. C. and Katznelson H., *Microbial Activities in Soil: V. Microbial Activity and Organic Matter Transformation in Palouse and Helmer Soils*. «Soil Sci.», vol. 46, n. 2, 1938.
- 44) Verona O., *Osservazioni sulla microflora dei terreni salsi*. Boll. Ist. Sup. Agr. Pisa, 1933.
- *Culture spontanee di cellulolitici aerobi «Cytophaga Winogradskii»*. N. sp. Estr. Rend. Acc. Naz. Sci., vol. 19, serie 6^a, fasc. 10, 1934.
- 45) Viljoen J. A., Fred E. B., Peterson W. H., *The fermentation of Cellulose by thermophilic bacteria*. Jour. Agric. Sci, vol. 16, 1926.
- 46) Von Gescher., citato da Riccardo.
- 47) Waksman S. A., *Studies in the Metabolism of Actinomycetes. III Nitrogen. Metabolism*. Jour. Bact., vol. 5, n. 1, 1920.
- *La cellulosa e la sua decomposizione nel suolo per opera dei microrganismi*. Rend. Soc. Int. Sci. del Suolo, vol. II, n. 4, 1926.
- *The Origin and the Nature of the Soil Organic Matter of Soil «Humus»*. Estr. Soil Sci., vol. 22, n. 6, 1926.
- *The Role of Microorganisms in the Formation of «Humus» in the Soil*. «Soil Sci.», vol. 22, n. 6, 1926.
- *Chemical and Microbiological Principles underlying the Decomposition of Green Manures in the Soil*. Journ. Amer. Scien. Agr., vol. 21, n. 1, 1929.
- 48) Waksman S. A. and Diehm R. A., *On the Decomposition of Hemicelluloses by Microorganisms: 1) Nature, Occurrence, Preparation and Decomposition of Hemi-celluloses*. «Soil Science», vol. 32, n. 2, 1931.
- 2) *Decomposition of Hemicelluloses by Fungi and Actinomycetes*. «Soil Science», vol. 32, n. 2, 1931.
- 3) *Decomposition of Hemicelluloses by Aerobic and Anaerobic Bacteria*. «Soil Science», vol. 32, n. 2, 1931.
- 49) Wahsmann S. A. and Renn Ch. E., *Decomposition of Organic Matter in Sea Water by Bacteria*. Biol. Bullet, vol. 70, n. 3, 1936.
- 50) Waksman S. A. and Stevens K. R., *Processes involved in the Decomposition of Wood with Reference to the Chemical Composition of Fossilized wood*. Estr. Journ. Amer. Chem. Soc., 51, 1187, 1929.
- *A Critical Study of the Method's for Determining the Nature and Abundance of Soil Organic Matter*. Estr. «Soil Science», vol. 30, n. 2, 1930.
- 51) Winogradsky S., *La méthode directe dans l'étude microbiologique du sol*. Chimie et Ind., Paris, vol. II, n. 2, 1924.
- *Études sur la microbiologie du sol: 1) Sur la metode*. Ann. Inst. Pasteur, n. 39, 1925.
- *Sur la décomposition de la cellulose dans le sol*. Comp. Rend. Acc. Sci. Paris, 183, 17, 1926.
- *Études sur la microbiologie du sol: IV) Sur la dégradation de la cellulose dans le sol*. Ann. Inst. Pasteur, vol. 43, 1929.
- *Sur la décomposition aérobie de la cellulose par le bactéries*. Bull. Inst. Pasteur, vol. 30, n. 8, 1932.
- 52) Zampa P., *Il problema della cellulosa*, Giorn. «Italia Agric.», 1937.

STAMPATO COI TIPI DELLA
TIPOGRAFICA MILANESE
VIA FARINI, 5 - TEL. 67.916