



DOTT. PROF. GIACOMO ROSSI

PURE
CULTURE E FERMENTI SELEZIONATI

nell'industria e nell'agricoltura

(Estratto dagli *Atti della Società Italiana per il Progresso delle Scienze -*
IV Riunione - Napoli, ottobre 1910)



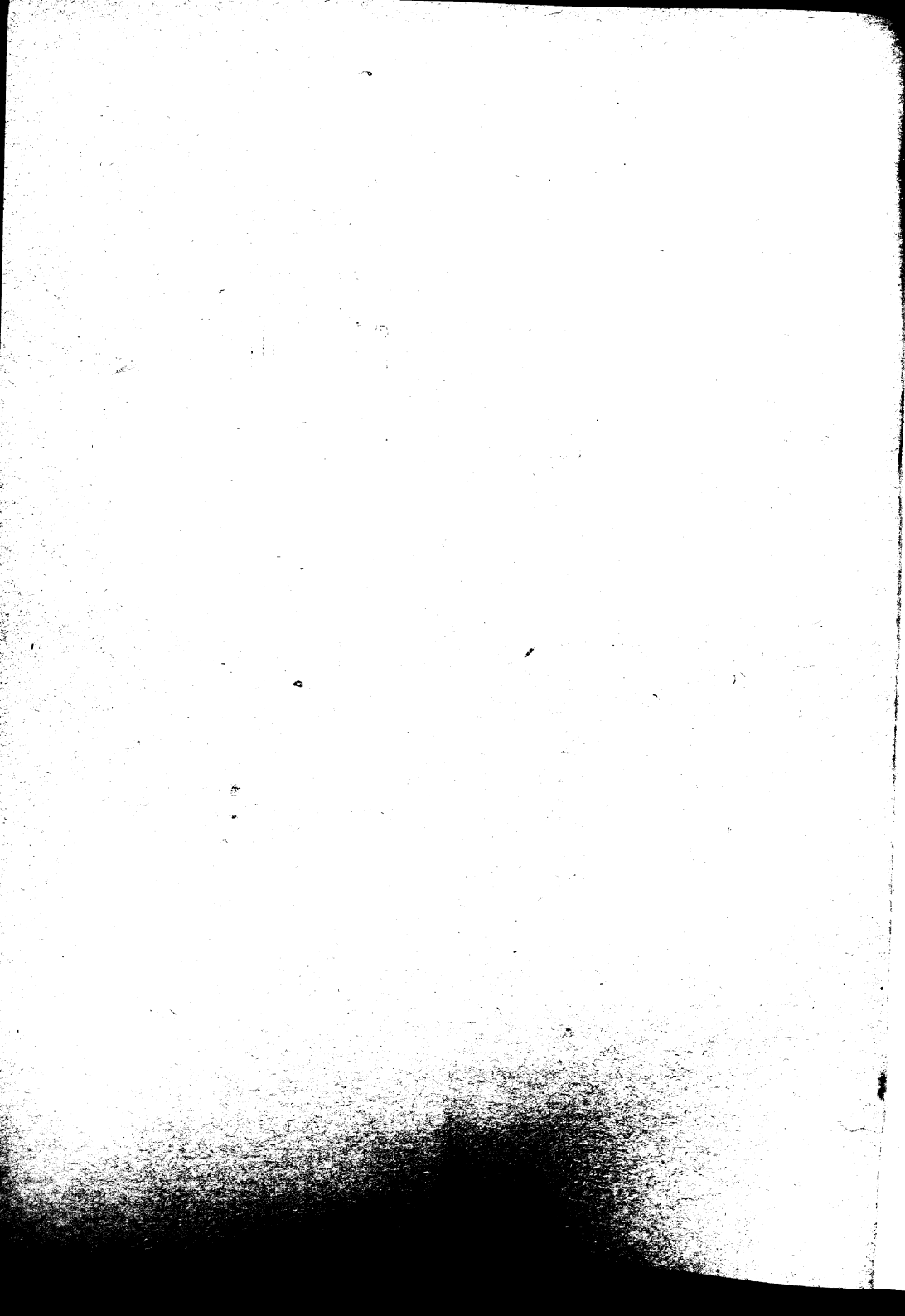
ROMA

TIPOGRAFIA NAZIONALE DI G. BERTERO E C.

Via Umbria

1911

32267



DOTT. PROF. GIACOMO ROSSI

PURE
CULTURE E FERMENTI SELEZIONATI

nell'industria e nell'agricoltura

(Estratto dagli *Atti della Società Italiana per il Progresso delle Scienze -
IV Riunione - Napoli, ottobre 1910*)

ROMA

TIPOGRAFIA NAZIONALE DI G. BERTERO E C.
VIA CAVOUR

1911

Culture e fermenti selezionati nell'industria e nell'agricoltura.

Dott. prof. GIACOMO ROSSI,

direttore del Laboratorio di batteriologia agraria
della R. Scuola superiore di agricoltura in Portici.

L'impiego delle culture pure dei microrganismi nell'agricoltura, e molto più nell'industria, rappresenta una brillante conquista della scienza moderna. È ancora uno dei tanti segreti strappati alla natura che l'uomo utilizza per il suo immediato vantaggio. E anzi, chi volesse filosofare, avrebbe, a questo riguardo, buon giuoco, pensando che non è più una scintilla del fuoco eterno quella che, noi ora, moderni Prometei, abbiamo rapita a Giove, ma bensì la *vita* intera che, con tutti i suoi misteri, asseconda l'opera affannosa dell'uomo.

E la concezione poetica regge tanto più quando si pensi che l'uomo ha, è vero, da tempo immemorabile, fatto suo pro delle cellule viventi, addomesticando animali, o coltivando piante, ma in questi casi non le ha utilizzate, mai, che come ciechi elementi di macchine produttrici di forze meccaniche o immagazzinatrici di materia. Mentre che, nel caso dei microrganismi, è uno sforzo quasi intelligente, e comunque non sostituibile, quello che è da noi impiegato. È la vera *forza vitale* di alchimistica memoria, quella che entra in giuoco.

Ma, come tutte le cose umane, l'idea dell'impiego delle culture pure nell'industria e nell'agricoltura, non uscì di getto dal cervello dell'uomo, al pari di Minerva armata dal cervello di Giove, ma bensì fu per una serie di trasformazioni successive, miglioramenti e perfezionamenti, che siamo arrivati allo stato attuale. Poichè è innegabile che il *lievito di birra*, il *lievito del pane*, il *latticello inacidito* delle latterie danesi, la *madre dell'aceto*, i *grani di kefir*, il *betun* dei tabacchi Avana, sono le culture pure dei secoli passati e ne rappresentano le forme primitive.

Tutte queste materie erano usate empiricamente e nei primi periodi (o, meglio, addirittura fino a meno di un secolo fa) se ne disconosceva affatto la natura, onde occorre arrivare fino a CAGNIARD-LATOUR e SCHAWN, nel 1836, perchè si riconoscesse che il lievito di birra era un

organismo vegetale, in caso di riprodursi spontaneamente e, purchè avesse un substrato nutritivo adatto, all'infinito.

Non è qui il caso di tracciare la storia degli studi che hanno condotto alle scoperte che in ognuna delle sostanze accennate esistevano microrganismi attivi, i quali erano la causa efficiente delle trasformazioni operate dai lieviti vari sia sul mosto di birra, sia sul pane, sia sul vino, sia sul latte, ecc., poichè ciò porterebbe troppo per le lunghe: invece occorre farci una esatta idea del significato preciso dei termini « cultura pura » e « fermento selezionato ».

Che cosa sia teoricamente una cultura pura a tutti è noto, intendendosi, con tale parola, una cultura batteriologica fatta esclusivamente da individui della stessa specie, varietà o razza. Praticamente è anche sinonimo del modo con cui questa cultura è raggiunta: e cioè di cultura che deriva dalla moltiplicazione di una sola cellula, schizo, blasto o ifomicetica.

Ed è noto che tale ultimo concetto è stato introdotto dal PASTEUR, il quale, trovando insufficienti i così detti metodi biologici per la creazione delle culture pure, ossia quei metodi coi quali ci si sbarazza delle specie estranee, collocando quelle di cui si va in cerca, nelle migliori condizioni di sviluppo (sia colla distruzione col calore dei germi coesistenti e meno resistenti, sia, in senso inverso, collocando, con culture frazionate, il materiale alla temperatura corrispondente all'*optimum* della specie ricercata, sia con culture in substrati appropriati, o culture elettive, fino al passaggio attraverso ad animali nel caso dei germi patogeni) escogitò dei mezzi meccanici per giungere allo scopo.

Ma poichè, ai suoi tempi, il mezzo di cultura più comune era il liquido (soprattutto il « brodo ») così anche il suo metodo non potè basarsi che sui liquidi, e consistette nel diluire il materiale contenente gli schizomiceti e i blastomiceti, in una certa quantità di liquido indifferente e sterile (p. es. acqua di fonte bollita) e nel frazionare in seguito il liquido stesso in un numero di porzioni superiore al numero delle cellule contenuto nella massa totale del liquido.

È naturale che ogni porzione di liquido, se le cellule erano state distribuite nel liquido stesso con assoluta uniformità, doveva contenere o una sola cellula o nulla. Ed allora, aggiungendo ogni frazione di liquido ad una provetta con altro liquido nutritivo, ne risultavano dei materiali sterili e dei materiali inquinati, questi ultimi derivanti da quella sola cellula che era pervenuta nel liquido.

Un esempio chiarirà meglio il metodo.

Si calcolava che un certo materiale contenesse 900 cellule: si sospendevano queste 900 cellule in un litro d'acqua sterile, si agitava a

lungo e fortemente e poi si divideva il litro in 1000 parti, versando ogni centimetro cubico in un tubo da saggio contenente brodo nutritivo e perciò impiegando 1000 tubi. Il risultato teorico era che 900 tubi si inquinavano e 100 restavano sterili; ma ogni tubo dei 900, non essendo stato inquinato che con una sola cellula, conteneva culture pure.

Come si vede, il metodo è semplice, ma incomodo; per cui ne nacquero ben presto delle modifiche le quali si adattavano man mano ai nuovi mezzi nutritivi che s'introducevano nella tecnica: onde le cosiddette piastre « strisciate » e « spennellate » sulle patate e finalmente le « piastre diluite » quando ROBERTO KOCH escogitò i mezzi nutritivi trasparenti solidificabili e fusibili a volontà, e cioè la gelatina e l'agar. E infatti il metodo di KOCH è alla fine quello del PASTEUR, colla sola differenza che la separazione stabile e definitiva delle cellule, una volta ottenuta coll'agitazione nelle gelatine fuse, viene mantenuta dal rapprendersi della gelatina che passa allo stato solido. In modo che, invece di aversi un intorbidamento generale del liquido nutritivo in cui viene messa una sola cellula, si ha invece la formazione di quello che si chiama la *colonia*, ossia un aggruppamento batterico solido il quale assume caratteri morfologici propri a seconda della specie e che è diventata uno dei più preziosi elementi diagnostici di cui disponiamo oggidì nella tecnica batteriologica. E questo metodo, che oramai si usa ordinariamente nei laboratori e si pratica colle comuni scatole di PETRI, è il fondamento della metodica di tutta la batteriologia moderna.

Ma è desso esatto nel vero senso della parola? Teoria e pratica rispondono unanimi di no, e si può invece dire che è soltanto un postulato e non un assioma che le colonie (e le rispettive culture) che si ottengono col metodo KOCH, siano veramente pure.

La *teoria* infatti, da un lato, ne fa avvertiti che nulla ci dice che lo scuotimento e l'agitazione del materiale conducano veramente ed in ogni caso a separare esattamente ogni individuo cellulare dagli altri, in modo che invece di una non siano due o più le cellule che danno origine all'inquinamento di uno stesso tubo nel caso del metodo PASTEUR e alla stessa colonia nel caso del metodo KOCH; e la *pratica* ne aveva ammaestrato che le culture del PASTEUR assai spesso non erano pure e la colonia del KOCH molto evidentemente è originata da uno o più individui anche di specie differenti, come ci accorgiamo quando vediamo colonie con più *nuclei* centrali o colonie grandi, risultanti evidentemente da parecchie piccole fuse, od altre ancora addirittura fatte così evidentemente di specie diverse, che, nelle colonie dei cromogeni, non di rado, si osservano colonie policrome, p. es. bianche e gialle, rosse e gialle, e così via.

Ben è vero che la pratica vuol dire molto e che, ad esempio, nei casi ora detti, è facile accorgersi che il metodo è fallito, come facilmente ci accorgiamo ugualmente che il metodo è in difetto quando colonie apparentemente omogenee risultano in realtà di individui morfologicamente differenti: ma quando il criterio morfologico più non suffragia noi non siamo più in caso di riconoscere l'errore.

Accenneremo più avanti di quanto male sia madre questa relativa insufficienza del metodo: per ora ci accontentiamo di dire che, anche così imperfetto, il metodo stesso rese servizi addirittura incommensurabili oltre che alla teoria ed alla scienza batteriologica in generale, alla pratica di quelle operazioni che riposano sull'utilizzazione delle attività chimiche dei microrganismi, vale a dire alle fermentazioni.

E per non deviare, ed andare dritti al nostro scopo, diremo subito che fu appunto la *fermentazione della birra* quella che ne risentì più di ogni altro ramo dell'industria, perchè, come le immortali scoperte di L. SPALLANZANI, sulla inesistenza della generazione spontanea, dello SCHEELE sull'aceto, dell'APPELL, dello SCHWANN, dell'HELMOLTZ, di SCHRÖDER e DUSCH e di molti altri, avevano, cinquant'anni prima, poste le basi e formata la teoria della tecnica della sterilizzazione e della disinfezione nelle operazioni industriali e fermentative, solo le scoperte di PASTEUR, dopo avere assicurato alle dette operazioni un campo di applicazioni anche più esteso (la pratica e l'importanza attuale della *pasteurizzazione* informino) fecero finalmente vedere che, molto spesso, le malattie dei liquidi che dovevano subire la fermentazione alcoolica erano dovute al lievito che si sviluppava, il quale, od originariamente al momento della introduzione, o posteriormente in seguito ad operazioni eseguite con poca cura, non era formato solo da blastomiceti della fermentazione alcoolica, ma anche da schizomiceti dannosi. Onde la soppressione delle tinozze scoperte (soprattutto nelle fermentazioni alte), dei refrigeranti scoperti, l'aereazione dei mosti con aria purificata, e la purificazione dell'aria nei locali di fermentazione, fecero ben presto sparire dalle fabbriche di birra molte temute malattie dei mosti e dei vini.

Ho detto molte, non ho detto tutte e con ragione: molti degli inconvenienti, cui si era soliti andare incontro nelle fabbriche di birra, e soprattutto alla mancanza di chiarificazione, alla formazione di gusti amari e così via, non erano stati eliminati colla eliminazione degli schizomiceti. Questa constatazione inaspettata rimase senza spiegazione fino al 1883, fino a quando cioè E. C. HANSEN coi suoi celebri esperimenti fatti nella fabbrica di birra di Vieux-Carlsberg a Copenaghen, dimostrò che tutte le malattie più temute e pericolose della birra non avevano, come dopo il PASTEUR si credeva, la loro origine nei batterii estranei;

ma bensì nei fermenti stessi che, erroneamente, si credevano puri; poichè in questi casi alla razza principale coltivata erano mescolate, in proporzioni maggiori o minori, altre specie di saccaromiceti che dovevano considerarsi come veri *fermenti di malattia*. E dimostrò che sotto il nome di *Saccharomyces cerevisae* si dovevano comprendere specie e razze differenti, le quali talvolta, mentre danno, separatamente presi, prodotti irreprensibili, mescolate danno occasione a vere malattie della birra. Onde ne segue che non si può avere regolarità nella fabbricazione della birra, se non ricercando metodicamente la razza conveniente, isolandola e propagandola in cultura sempre pura. Si veniva in tal modo a mettere in chiaro la manchevolezza del metodo del PASTEUR ed a stabilire in modo certo che la morfologia è insufficiente a caratterizzare i microrganismi, le loro proprietà vitali rilevando differenze ove il microscopio più potente non rileva diversità di forma. Ed è noto il metodo dell'HANSEN proposto per arrivare allo scopo di avere la sicurezza matematica della cultura pura. Egli introdusse la così detta *einzel-kultur* che io ho chiamato *cultura monocitogenetica*; nomi che ne indicano la natura e si pongono in pratica, come universalmente è noto, assicurandosi prima al microscopio che l'origine della cultura è proprio una cellula sola.

Sia il metodo originale dell'HANSEN (che si esegue con specie di gocce pendenti solide di gelatina che si possono agevolmente sottoporre al microscopio) sia le modifiche successive del LINDNER (o cultura in tratto di penna) dello SKOUTEN, che ideò anche apparati speciali, del BURRI o cultura al punto d'inchiostro di China) ed anche dei miei assistenti, dott. D. CARBONE e compianto dott. T. ZONA, permettono oggigiorno di avere culture pure con esattezza matematica.

Non è qui il luogo d'insistere sui vantaggi che tale metodo può dare alla batteriologia generale e patologica, ma basterà accennare che uno studio serio sui problemi fondamentali del polimorfismo batterico (la variazione spontanea o mutazione di UGO DE VRIES) e sulle variazioni individuali o parziali dei microrganismi, sull'esistenza di razze differenziate nei gruppi batteriologici complessi, quali quelli del *B. coli*, del *B. vulgare*, degli streptococchi, dei diplococchi, delle sarcine e così via, non è possibile se non si lavora con cultura monocitogenetica: onde, per restar fedeli al nostro programma, diremo solo che nell'industria della birra, la cultura monocitogenetica portò finalmente all'uso dei « fermenti selezionati » e cioè al potere compiere tutta la fermentazione con una specie o varietà (che può essere ottenuta anche artificialmente) sola, adatta e conveniente per il fine che si vuole ottenere.

La fabbricazione delle birre, soprattutto a fermentazione bassa, non ha, al giorno d'oggi, più incognite: entro limiti vastissimi è in potere

del fabbricante ottenere birre amare, birre dolci, birre chiare, birre scure, e così via, e tutto questo, oltre ai grandi progressi fatti negli altri rami, maltaggio e saccarificazione, in grazia dei « fermenti veramente puri » e selezionati, (per i quali acquistarono veramente valore pratico gli « apparecchi refrigeranti » e le altre regole profilattiche contro le infezioni) che si possono mantenere puri mediante gli apparecchi di propagazione automatica e si possono far viaggiare in tutta sicurezza dalla zona glaciale ai tropici.

Da quanto precede, parmi risulti chiaramente la differenza fra cultura pura e fermento selezionato, poichè la prima è un dato di fatto, ossia attuale, che solo un metodo razionale ci può dare; e la seconda invece è un dato potenziale che indica la ricerca metodica, fra le varie culture pure, della più conveniente al fine proposto: termini correlativi adunque, in quanto il secondo non ha valore se manca il primo, ma anche ben distinti, perchè mentre il primo, la cultura pura, deve essere ottenuta dal batteriologo e contempla un lavoro eminentemente scientifico, il secondo invece, il fermento selezionato, deve essere fatto dall'industriale (o almeno colla sua collaborazione) e contempla un lavoro eminentemente pratico.

Volgarmente per altro i due termini sono sinonimi: la selezione invece di riferirla alla razza viene ordinariamente riferita alla specie che domina in un processo: e sbarazzare il processo dalle specie estranee lasciandovi dominare la specie o le specie che si credono attive, si chiama anche « selezionare il fermento del processo », mentre che in realtà ciò non corrisponde ad una vera selezione, ma soltanto alla lavorazione con una cultura pura.

In altri termini in molti casi così ci si esprime come se si fosse già raggiunta soltanto la « condizione » indispensabile per giungervi.

Io non ho parlato, e spero che voi l'abbiate compreso, così a lungo della fabbricazione della birra che per tracciare con precisione le origini dei concetti di fermento selezionato e di cultura pura: ma chi sia anche mediocrementemente colto in microbiologia ben sa che, oramai, è riconosciuto che in tutti i fenomeni dell'agricoltura (ed in molti dell'industria) il microrganismo presenta una importanza principale o secondaria; onde è forse difficile trovare un capitolo dell'agricoltura o della industria in cui, direttamente od indirettamente, non vi siano stati tentativi più o meno fondati e più o meno riusciti di applicazione dei « fermenti selezionati ».

Dirvi ora di tutti questi tentativi, dirvelo colla larghezza e colla estensione necessaria, mi porterebbe troppo per le lunghe; e mi accontenterò di accennare soltanto i principali.

Incominciamo dalla vera palestra dell'agricoltura, vale a dire dal *suolo*: poichè ad onta delle difficoltà che *a priori* tali tentativi presentano, gli sforzi dei batteriologi non hanno mancato di rivolgersi anche al suolo stesso per influenzare (oltre che indirettamente anche direttamente) i processi microrganici che la scienza è venuta in questi ultimi anni scoprendovi e precisandovi.

Osserva però il LÖHNIS come, al pari che in ogni altro caso analogo, così anche nel terreno sarebbe stato logico aspettarsi un successo, dall'inoculazione di determinati microrganismi, soltanto quando per questi fossero state presenti determinate condizioni di esistenza.

E questo fatto, per quanto tale da comprendersi agevolmente, non di rado fu completamente dimenticato, di modo che i risultati sperimentali dell'applicazione di culture pure al terreno, se furono spesso contraddittori, molto più spesso furono negativi.

E del resto è logico che solo quando saranno sufficientemente chiariti i rapporti della microflora del suolo colle proprietà del suolo stesso e con quelle impartitegli dalle varie coltivazioni e lavorazioni e dalla concimazione, e come pure ci saranno meglio note le relazioni fra suolo, clima e stagioni, allora solo, dico, potremo aspettarci con sicurezza dei successi dall'introduzione artificiale nel terreno agrario di batteri ed altri funghi.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze possiamo ammettere che l'uso di culture pure nel suolo può forse essere impiegato in casi assolutamente eccezionali, ma dobbiamo contemporaneamente ritenere che siamo ben lungi dall'essere in grado di sostituire delle culture pure alle culture impure che la pratica agraria ha usato da secoli e millenni e che sono rappresentate dal letame e dal terriccio.

Comunque, i tentativi per influire direttamente sulla flora del terreno, si possono dividere in due categorie: una è data dalle esperienze dirette a modificare la composizione batterica del concime di stalla, e l'altra comprende gli sforzi fatti per la sostituzione del medesimo (parziale o totale) con culture pure artificiali di microrganismi.

La prima categoria è assai ristretta perchè il metodo proposto dal DEHERAIN per il miglioramento dello stallatico, fondato razionalmente sulle nostre conoscenze biologiche e consistente nello spargere sul suolo delle concimaie una parte di stallatico ben macerato (il che agevola la decomposizione del materiale nuovo che viene sovrapposto e soprattutto la produzione dell'acido carbonico, come ha potuto confermare lo SCHNEIDEWIND), questo metodo, dico, appartiene ancora al regno della cultura empiricamente impura. Onde sono solamente le esperienze di HILTNER che pensò di impedire le perdite di ammoniaca nel letame

colla inoculazione di ammoniofagi e quelle di BARTHEL, che tentò (e riuscì) a raggiungere lo stesso scopo coll'aggiunta di batteri dall'acido lattico, che si possono citare da questo punto di vista. Senza contare che nel caso delle ricerche del BARTHEL è ancora dubbio se il successo fosse dovuto alla particolare, quasi antagonistica, azione che i batteri dell'acido lattico esercitano verso i denitrificanti, o non piuttosto al lattosio che formava l'eccezionale culturale e che veniva trasformato in acidi dagli ordinari batteri dello stallatico.

Più numerosi ed importanti sono i tentativi della seconda categoria, pur tenendo presente quanto ho detto or ora sui difetti fondamentali di tutte queste esperienze.

Così è anzitutto doveroso menzionare quelli rivolti ad introdurre nel terreno culture artificiali di *nitrificanti* che nelle mani di MARCILLE, HOHL e di P. EHRENBERG (che operò con terreni poverissimi di calce) diedero risultato negativo, mentre il KRAINKY asserisce d'avere avuto buoni risultati colle celebri terre nere russe.

Ed è bene di ricordare che nemmeno sono mancati tentativi addirittura industriali su questa direttiva: onde per un certo tempo si ebbe in commercio la *chilinite*, fabbricata da uno speciale sindacato olandese che si era formato in Delft, e fabbricata secondo le indicazioni del BEDDIES, già noto per altri processi microbiologici brevettati e soprattutto quello per la ossidazione della torba come materia prima per la carta. Essa era composta di batteri nitrificanti e nitrosanti mescolati a farina fossile e avrebbe dovuto essere attiva soprattutto se sparsa contemporaneamente ad *humus*; ma non se ne ottenne mai alcun pratico risultato.

Si ebbe anche una *chilinite* tedesca ed austriaca proposta dal WENK di Magdeburgo, per la cui preparazione erano utilizzati i residui delle fabbriche d'alcool. Ma in questo caso, con ogni probabilità, l'utile effetto del prodotto nel suolo era da ricondursi alle sostanze nutritive, che accompagnavano i batteri, in quantità abbastanza considerevoli e fino a formare il 45 % della sostanza organica del prodotto.

Il che spiega perchè SVOBODA ottenesse gli stessi buoni risultati, con tali sostanze nutritive, trascurando per altro i batteri.

Dopo la nitrificazione, la *fissazione diretta nel suolo dell'azoto* per opera di microrganismi specifici ed in generale l'influenzamento diretto dei processi del suolo, ottenuto coll'aumentare la flora normale, è stato oggetto di molti studi, ricerche e speranze, ma ha condotto anche a clamorosi ed inevitabili insuccessi, dovuti sopra tutto al modo onde furono impiegate. Quello che, come dicemmo, domina sopra tutto in queste esperienze è la « contraddizione » facilmente spiegabile col fatto

che, difficilmente, i diversi ricercatori si sono potuti collocare nelle stesse condizioni sperimentali. Onde non è a meravigliarsi se l'inoculazione nel suolo delle specie che formano la flora normale del terreno, rilevabile coi terreni culturali solidi, albuminati e trasparenti, sia stato a volta a volta dichiarata utile da CARON, STOKLASA (cogli ordinari radiciformi, sottili, megateri, colisimili, fluorescenti) e da HILTNER coi denitrificanti: inutile da REMY e EHRENBURG e perfino dannosa da STIGELL.

Nè fecero difetto anche in questo campo i tentativi industriali ed una delle sostanze che ha avuto maggior voga è stato indubbiamente l'alinite, messa in commercio dalla ditta « Bayer e C. » di Elberfeld, e consistente soprattutto nelle spore del *B. Ellenbachensis* del CARON, nelle due varietà α e β , ma anche di quelle del *Bacillus mycoides* e di *ifomyceti*, mescolate con fecole di patate.

Le prime prove con questi preparati rimontano al 1897 e si prolungarono fino al 1900 e su di esse riferirono favorevolmente parecchi autori. Così lo STOKLASA ottenne, coll'avena e coll'orzo, un maggior prodotto anche del 50 per cento e consigliò, per assicurare l'esito della pratica, di ricoprire i semi con glucosio e di aggiungere xilosio, paglia ed estratto torboso: LUTOSLAWSKI ottenne, coll'alinite, un aumento del 20 per cento: MALPEAUX la trovò utile per i terreni umosi: GAIN ebbe utili risultati per il lino ed il grano saraceno: V. SCHUTZ, nella Prussia occidentale, su 20 prove, ebbe due soli insuccessi e si ripromise di migliorare il sistema brevettandone le modifiche. Ma mentre, inoltre, ottennero buoni risultati anche DAMSEAUX, KOSSOWITSCH, SEMPOLOWSKI e SALZER, per contro O. LEHMANN, LAUCK, GERLACK, KRUGER e SCHNEIDWIND, MÄCKER, i due SCHULZE, HALSTED, HILTNER, H. VON FEILITZEN, SEVERIN e TACKE, non ottennero invece nessun miglioramento del prodotto, quando non ottennero invece diminuzione. In seguito a questi risultati (i favorevoli si spiegano, al solito, facilmente, ammettendo che l'azione favorevole era dovuta non già ai batteri ma bensì alle sostanze che li accompagnavano) il preparato fu, dopo breve tempo, ritirato dal commercio.

Seguì l'ammoniogeno del KONING, formato dalle spore del megaterio e del radiciforme e che doveva essere sparso sul terreno in forma liquida o in pastiglie. Però questa sostanza, solo nelle mani del suo autore fu capace di favorire sia la solubilizzazione dell'azoto del terreno, sia l'assimilazione dell'azoto atmosferico.

Ma il processo microbiologico del terreno, il cui uso artificiale ha dato origine a maggiori studii e a maggiori discussioni e che ancora conta molti fautori ed apostoli, è certamente quello che riguarda la fissazione dell'azoto atmosferico sotto l'influenza dei tubercoli radicali delle

leguminose, questi alla lor volta sotto l'influenza degli speciali batteri cui è legata la loro origine. Di questo vi parlerò con una certa larghezza, seguendo il riassunto che già ne ha fatto ultimamente LÖNNHIS.

Più precisamente i problemi che riguardano l'attecchimento delle leguminose in terreni che fino allora fossero stati refrattari per dette specie e l'aumento della produzione in tutti gli altri casi, sono stati presi di mira.

E infatti, se l'inoculazione di terreno per l'attecchimento delle leguminose è da tempo conosciuta ed impiegata; e, nei più svariati territori, e da secoli, è stata conosciuta ed utilizzata l'esperienza che nelle maremme e nelle brughiere si assicurava una sufficiente introduzione di sostanze nutritive colla prosperazione delle leguminose, quando il terreno è anzitutto ricoperto con terra vegetale fertile, e se ancora da poco tempo, SALFELD ha data base scientifica a questo processo nelle sue esperienze fatte in Olanda in seguito alle classiche ricerche di HELLRIEGEL e WILFART, da ben meno tempo si è tentato di risolvere il problema colle culture pure dei batteri specifici, la cui specie più frequente è nota comunemente col nome di *Bacterium radicola*.

Onde quando nel 1896 le fabbriche di colori di Höchst, MEISTER, LUCIUS e BRÜNING, misero in commercio la « *nitragina* » fabbricata secondo le indicazioni ed i brevetti di NOBBE e HILTNER in seguito alle esperienze condotte, fino dal 1890, dagli stessi, nella stazione di fisiologia vegetale di Tharand, fu per il primo anno uno scoppio generale di entusiasmo, cui succedette ben presto, negli anni successivi fino al 1903, lo scoraggiamento e la sfiducia: basta percorrere l'oltremodo ricca letteratura per persuadersi di questo cambiamento dell'opinione pubblica.

Le cause di questi insuccessi si vollero allora trovare nel modo poco conveniente di preparazione della sostanza. E infatti mentre J. KUHN e B. FRANK dissero tosto che il *B. radicola* aveva perduto il suo potere nella cultura artificiale, NOBBE ed HILTNER dissero che invece esso si esaltava troppo sui terreni a base di gelatina con estratto di leguminosa e quindi ne originavano tubercoli inattivi. E per vero J. SIMON, ultimamente ha fatto vedere che nei detti terreni, a base di estratti di leguminose, si accumulano rapidamente prodotti di ricambio molto dannosi; il che non avviene coll'impiego di estratto di terra.

Inoltre anche il modo di inoculazione aveva bisogno di miglioramenti. Per cui già nel 1899, HILTNER col NOBBE sostituì il latte all'acqua nella preparazione del liquido di inoculazione, e poi, collo STÖRMER, introdusse altre importanti modifiche (quali l'aggiunta di peptone e di glucosio al latte da usarsi per lo spappolamento delle culture in agar, e la scelta dei tubercoli più attivi per l'estrazione dei batteri)

giungendo, apparentemente almeno, a preparati ad azione più certa ed a metodi sicuri di inoculazione. Tutto questo diede poi origine ad una nuova nitragina (posta liquida in commercio) che venne provata su vasta scala per ben 5 anni (dal 1903 al 1907) nell'Istituto botanico di agricoltura di Monaco, da cui veniva fornita ai soli agricoltori bavaresi ed in tale larghezza che dal 1904 al 1907 si distribuirono ben 20,174 culture.

In seguito, nel 1898, lo smercio della nuova nitragina (nuovamente patentata dal KÜHN) fu assunta dal suo laboratorio chimico biologico di Monaco e nel 1° gennaio 1909 il laboratorio, col nome di *Nitragin-Zentrale*, passò da Monaco a Bonn mentre che nell'agosto dello stesso anno la ditta assunse il nome di *Agriculturwerke* in Wesseling, Köln e Bonn.

Intanto le esperienze avevano messo in chiaro che l'inoculazione con nitragina non si deve fare sempre nello stesso modo per assicurarne i risultati: così nei terreni paludosi e ricchi di *humus* è preferibile l'inoculazione diretta ed inutile l'aggiunta di sostanza nutritive, che è anche meglio tralasciare nei terreni ricchi di calce.

Molto bene agisce l'aggiunta di Ca CO_3 , $\text{Ca}^3 \text{PO}_4$, preparati di humus polvere di latte, mentre invece sono dannosi i perfosfati e la calciocianamide. Il peptone ed il glucosio sono sorpassati spesso da altre miscele, e specialmente da peptone e saccarosio.

Ed inoltre, qualche volta, si possono avere grandi incertezze sull'inquinamento quando abbiano preceduto altre culture di leguminose diverse. Così GERLACH e VOGEL trovarono, per i lupini, che se avevano preceduto i lupini il raccolto era scarso; buono se aveva preceduto serradella e nullo se aveva preceduto la soya.

STÖRMER trovò che l'impolveramento dei semi inoculati con creta e gesso è utile: SCHNEIDER constatò buoni risultati con culture cresciute in creta: REMY ritenne che il momento più opportuno per l'inoculazione dei campi sia quello in cui sono già presenti dei peli radicali capaci d'infettarsi: SUCHTING ammise, contrariamente a NOBBE ed a HILTNER, che è meglio usare grandi quantità di materiale inoculante.

Si è poi potuto constatare che pur ottenendosi aumento d'azoto nel terreno, si può anche non avere un aumento nel raccolto (e questo nei terreni già sufficientemente ricchi di batteri adattati) in modo che la nitragina può riuscire dannosa.

Volendo concludere nei riguardi di questa « nuova nitragina », noi diremo che essa ha ancora più di una incertezza ed è a temersi che anch'essa finisca col fare la fine della prima. Comunque, è chiaro che qualora essa pur avesse ogni consistenza a base scientifica, verrebbe il giorno in cui l'agricoltore potrebbe da essa prescindere, poichè, pur anco

supponendo che la nitragina raggiungesse un giorno o l'altro il massimo significato e cioè potesse veramente fare attecchire specie nuove in terreni ad esse refrattarii, basterà, con risparmio di spesa e di fatica, dopo avere ottenuti risultati favorevoli in piccole parcelle sperimentali, usare la terra così arricchita per ulteriori inoculazioni.

Su questa concezione è infatti basato un preparato analogo alla nitragina, l'*Azotogeno* del SIMON, posto in commercio dalla sezione batteriologica della fabbrica chimica di TUMMAN e HEISLER, di Dolna presso Dresda, nella primavera di quest'anno. Essa è fondata sul fatto, constatato dal SIMON stesso, che il *B. radicola* si sviluppa bene nella terra e vi conserva, anche con un moderato disseccamento, ogni potere infettivo, e ogni proprietà rispetto alla fissazione d'azoto per un tempo relativamente lungo. E l'azotogeno, sulla cui importanza poco sappiamo, può essere utilizzato, una volta sciolto nell'acqua, sia per bagnare i semi, sia mescolato con una sufficiente quantità di terra per inoculare direttamente il terreno.

Si sono avute anche molte altre « nitrachine »: così il MOORE ne indicò una in cui i batteri radicali erano seccati sull'ovatta: onde la necessità di farli sviluppare prima dell'uso in una soluzione di zucchero e peptone. Questa prima nitragina americana era fornita dalla « Nitrocultur Company » (West-Chester, Pa.) ma ad onta di pochi casi favorevoli, si dimostrò, nella grandissima maggioranza delle volte, sprovvista di valore, tanto che anche 16 stazioni agrarie americane si schierarono apertamente contro. E infatti SIMON ha mostrato che il *B. radicola* muore rapidamente conservato in ovatta ed esposto alternativamente all'aria asciutta e umida.

In America, oltre quelle di MOORE si sono avute altre proposte di sostanze da inoculare. Così il Dipartimento dell'Agricoltura degli S. U. d'America forniva, fin dal 1906, culture liquide le quali non hanno avuto ancora conferma pratica, e diverse ditte hanno posto in commercio buon numero di preparati analoghi per lo più sprovvisti di valore: anzi il *farmogerm* dell'« Earp-Thomas Farmogerm Co. » di Bloomfield (N. J.) non è, secondo HILTNER, che la sua nuova nitragina. Migliori risultati avrebbero date le culture di alcune Stazioni sperimentali Americane: dalle quali, p. e. nella Virginia, si sarebbe avuto anche l'82 per cento di casi favorevoli. Ed anche nel Canada, le esperienze di EDWARDS e BALOW avrebbero dato il 62 per cento di successi.

Anche il Messico e la Nuova Zelanda hanno preparato culture da inoculare, con vario esito.

L'Inghilterra non è rimasta indietro ma la *Nitrobacterina* (o *nitrogeno*) (specie di nitragina secca) preparata da BOTTOMELEY e provata,

oltre che quivi, in Svezia ed in Germania ed anche in altri paesi, si dimostrò incerta o inutile.

Ciò forse perchè, al pari di quella del MOORE, era usata l'ovatta per la conservazione dei batteri, in modo che il *B. radicolica* non vi sopravvive. Inoltre le culture erano ricche di spore di batteri anaerobici dell'acido butirrico.

BOTTOMELEY, STOKLASA, STRANĀK però poterono riferire di avere avuto finora buoni risultati nella inoculazione, non solo di leguminose ma anche di orzo, avena, barbabietole, cavoli, canna di zucchero, fragole, ecc. Altri ottennero risultati pratici solo in casi eccezionali e di regola negativi: il che, avuto riguardo alla possibilità della diffusione ed al facile rinvenimento dei batteri fissati d'azoto, non può meravigliare.

Di modo che, come conclusione generale nei riguardi dei « fermenti selezionati » per la fissazione dell'azoto coi tubercoli radicali delle leguminose, possiamo solo dire che l'incertezza ed il dubbio vi regnano ancora sovrani.

Nè ciò è a meravigliare, poichè ben sappiamo che nemmeno le vedute teoriche sulla fissazione dell'azoto sono completamente chiare, e, comunque, ben lungi dal formare un tutto organico. Se ancora non sono noti i veri rapporti fra leguminose e tubercoli, onde s'ignora con sicurezza se questo è un prodotto normale o patologico della pianta, se vi ha perfino chi ha asserito, come il nostro GINO DE ROSSI ed apparentemente con ogni fondamento, che la maggior parte degli sperimentatori non ha avuto nelle mani i « veri » microorganismi dei tubercoli; e se vi ha chi toglie ogni valore anche a questi « veri » agenti dei tubercoli come agenti fissatori d'azoto, e se, infine, vi ha chi non esita a sostenere che il modo di fissazione dell'azoto è unico nel suolo, e che le leguminose, ed i loro tubercoli, solamente indirettamente agiscono su tale processo, è logico che anche i risultati della nitragine, siano così incerti e contraddittori.

Passando ora ad altri campi, dobbiamo fare cenno di un gruppo di tentativi di applicazione dei fermenti selezionati che riflettono pratiche intermedie fra l'agricoltura e l'industria, ossia appartenenti alle cosiddette industrie agrarie.

Uno di questi è quello che riguarda la *conservazione di speciali foraggi* per mezzo del silaggio. E poichè il non di rado poco soddisfacente risultato della pratica ordinaria si deve attribuire ad una mancanza di batteri dell'acido lattico, si è cercato parecchie volte di ovviare agli inconvenienti e ciò aggiungendo al materiale, nel più semplice dei modi, latte acido o siero acido.

Per le erbe infossate non si sono avuti buoni risultati ma non pare sia così per uno speciale foraggio che ha anche una grande importanza in Italia (almeno in certe regioni) e cioè la fettuccia delle barbabietole dopo la diffusione.

Quivi, il fondamento scientifico è appunto di impedire che i batteri del gruppo del sottile, quelli della decomposizione della cellula *et similia* (i quali essendo sporigeni hanno resistito alla temperatura della diffusione) prendano il sopravvento, con produzioni di odore e sapore sgradevoli e perdita di sostanza, a scapito dei pochi del gruppo dell'acido lattico che sono sopravvissuti; e quindi necessita la loro inoculazione artificiale. E in questo campo dai primi studi di HERSFELD (nel 1895) e di EPSTEIN nel 1902, siano ora arrivati al metodo di RENATO SARCIN, col suo commerciabile fermento *Lacto-Pülpe*, il quale contiene i microrganismi isolati dal BOUILLANT.

Anche nell'industria delle tessili l'introduzione di *metodi microbiologici di macerazione* è dovuta soprattutto agli inconvenienti che presentano i metodi rustici; ma anche i difetti intrinseci dei metodi chimici, coi quali si sono voluti sostituire i metodi rustici stessi, vi hanno contribuito in buona parte.

E infatti i molti metodi chimici (che del resto, assai probabilmente, tutti si riducono ad un tipo solo come uno solo è lo scopo che si prefiggono: disciogliere le sostanze interfibrillari a mezzo di un reagente chimico, l'eccesso del quale viene poi neutralizzato ed allontanato, senza intaccare le fibre) non possono *a priori* essere destinati a darci risultati brillanti e soprattutto costanti, per due ragioni principali, la prima delle quali è legata alle condizioni anatomiche delle fibre tessili, e la seconda alla loro composizione chimica.

La ragione anatomica è legata, alla sua volta, al fatto che tutti i fusti dai quali si devono liberare le fibre, non hanno esattamente la stessa età e quindi le loro fibre lo stesso spessore.

Conseguentemente nemmeno la « quantità » di sostanza intercellulare dissolvenda può essere la medesima in tutti i punti.

Ma questa condizione, della possibilità di un effetto o di un difetto di reattivo, non avrebbe influenza, perchè basterebbe mettersi nelle condizioni più facilmente raggiungibili, vale a dire nel caso di un eccesso, qualora non fosse legata colla seconda ragione di impossibilità di riuscita dei metodi chimici, cioè colla impossibilità di possedere un reattivo specifico per le sostanze intercellulari, e cioè *un reattivo che, attaccando esclusivamente le sostanze pectiche, rispettasse assolutamente la cellulosa delle fibre.*

E egli possibile un simile reattivo?

Da quanto conosciamo sulla macro e microchimica delle sostanze intercellulari, la *risposta non può essere che negativa* e si può asserire che, data l'affinità che passa fra gli idrati di carbonio e le sostanze pectiche, *qualunque reattivo che attacchi fortemente le prime, deve, di necessità, attaccare, almeno leggermente, le seconde*. Naturalmente se poi, per evitare l'inconveniente, si mettesse il reattivo in difetto, si arrischierebbe di avere delle fibre non abbastanza degommate. Ed è per questo che tutti i mezzi chimici, come si dice in gergo commerciale, *sforzano la fibra*. È evidente, per altro, che un difetto analogo è anche proprio dei metodi microbiologici ordinari, ossia delle macerazioni rustiche.

Troppo facilmente in queste, oltre ai batteri della fermentazione pectica, si sviluppano anche altri batteri e soprattutto quelli della cellulosa, perchè non siano a temere guasti alle fibre, analoghi a quelli che vi può indurre un reattivo chimico comune alle due sostanze.

Solo nel caso che si abbia la fortuna che si sviluppino esclusivamente dai microbi fermenti pectici specifici, o che almeno, per un certo tempo, essi prendano il sopravvento esclusivo, possiamo ritenere che la macerazione microbiologica decorrerà senza inconvenienti: rimarrà, per altro, sempre il compito, non facile sempre nè sempre possibile, di arrestare la macerazione stessa, estraendo dai liquidi le tessili quando si comprenda di essere arrivati al limite che non deve essere oltrepassato. E diciamo non sempre facile, perchè basta, viceversa, vedere la facilità con cui una partita di canape o di lino è dichiarata « troppo macerata » e come tale di prezzo infinitamente minore, per comprendere come sia possibile che anche i più esperti coloni s'ingannino in proposito.

In questo stato di cose, solo un fermento, figurato o solubile, specifico delle sostanze pectiche, il quale *agisca in cultura pura* se microbo, da solo se enzima, può ovviare a tutte le difficoltà, poichè soltanto da una reazione biologica si può attendere quel grado di sensibilità che è richiesta dallo specialissimo problema.

Il *Penicillium brevicaulis* che sostituisce il metodo di MARSH e che è infinitamente più di lui sensibile nel rilevare le tracce di arsenico, sta ad indicare che non è vana speranza attendere dalla microbiologia quello che la chimica non ci ha potuto dare.

Onde è, che i metodi microbiologici di macerazione saranno certamente i metodi dell'avvenire. E poichè l'unica obiezione seria, mossa a questi metodi, quella cioè che colle culture pure si ottiene, assai più che non colla macerazione rustica, la risoluzione dei fasci fibrosi in fibrille elementari, si può rispondere colle parole di FREMY: *Croit on que les fibres du lin et du chanvre soient purifiées d'une façon complète? ne pourrait on pas leur donner un plus grande valeur en enle-*

vant les substances étrangères qu'elles retiennent et qui les empêchent souvent de donner des fils fins et soyeux ?

Ossia che, in altri termini, colla macerazione microbiologica si inaugurerebbe tutta una nuova era nelle industrie tessili.

Molti sono oramai i metodi microbiologici di macerazione proposti, ed anzi essi si possono ricondurre a due categorie: quelli in cui l'aggiunta di un « fermento selezionato » rappresenta la parte accessoria e quelli in cui tale aggiunta rappresenta la parte principale. Nella prima categoria la parte principale è pur sempre data dalla flora naturale utile che si cerca favorire nel miglior modo.

In questa categoria annoveriamo, oltre gli antichi ed immaturi processi di ALLISON e PENNINGTON e della prima Società tedesca del Ramie di Emmendingen, e che non hanno più che un puro valore storico, il processo brevettato di v. STEENKISTE e LEGRAND di Anversa e tendente ad assicurare al *Granulobacter pectinovorum* ed al *G. urocephalum*, gli agenti specifici del processo naturale, secondo BEIJERINK e VAN DELDEN, le migliori condizioni d'esistenza: il che si raggiunge con dispositivi meccanici e anche col versamento di culture pure.

Alla seconda categoria appartiene:

A) il processo DOUMER e DESWARTE (brevetto AUGUSTO LAMBLING), di scarso valore scientifico, fondato esclusivamente sull'uso d'ipotecie culture di *Bacillus amylobacter* (al momento della comparsa del metodo e prima della nuova concezione sistematica di BREDEMAN e ARTURO MAYER, vera *sammel-species*);

B) il processo di STÖRMER, non coperto, ch'io sappia, da alcun brevetto e fondato sull'uso di culture pure, oltre che dall'agente specifico (*Pectridium pectinovorum*), anche di microrganismi secondari;

C) i processi escogitati dal mio Istituto e fondati sull'uso di fermenti pectici aerobici (prototipo dei quali è il *Bacillus Comesi*, da me dedicato al nostro illustre presidente di sezione) contrariamente a tutti i precedenti, fondati come abbiamo visto sull'uso di fermenti pectici anaerobici. I pectici aerobici vengono fatti agire, per intensificarne e regolarizzarne l'azione, in una corrente d'aria.

Comunque, e qualunque sia il metodo da impiegarsi, non è vano aspettarsi dai « fermenti selezionati » applicati alla macerazione delle tessili, una serie non indifferente di vantaggi, quali la durata minore e costante del processo, la possibilità di applicarlo durante tutto il tempo dell'anno e sottrarlo a tutte le influenze meteorologiche esterne, il maggior rendimento, il prodotto più fino, più uniforme, più bianco e più resistente, l'impossibilità di passare il punto ottimo della macerazione ed infine il costo minore.

Ma del resto chi ha percorso, durante la stagione estiva, le provincie di Caserta e Ferrara, dell'Emilia e della Romagna e le ha trovate, ad ogni piè sospinto, inquinate, avvelenate, rese inabitabili dal maceratoio, che per centinaia di metri attorno « fa spiacere suo lezzo » ha visto le macabre scene del « Carbone » di Marcianise o del lago di Patria, ha assistito alle operazioni di macerazione e si è reso conscio della vita che conduce il contadino durante la macerazione stessa, non può, indipendentemente da ogni considerazione scientifica ed economica, non aspirare, con tutte le sue forze, a che un simile stato di cose sparisca, e che il maceratoio, che, se non è più a ritenersi un fomite di malaria, è sempre un attentato alla salubrità chimica dell'atmosfera, non sia più, in un breve volger d'anni che un puro ricordo storico.

Ma il maceratoio sparirà indubbiamente perchè è legge di progresso, è legge di divisione del lavoro, che il prodotto non sia lavorato dal produttore.

Numerose sono poi le applicazioni dei fermenti selezionati alle industrie vere e proprie e l'industria casearia ha già da tempo obbedito alla gran legge ora rammentata della divisione del lavoro: onde da tempo si può considerare come affatto indipendente dall'agricoltura che si limita a fornirle la materia prima. E i fermenti selezionati hanno perciò con maggiore facilità potuto introdursi in questo campo, già pronto a ricevere ed apprezzare ogni perfezionamento tecnico.

Il primo passo fu fatto colla così detta *burrificazione previa acidificazione della crema*. Per comprenderne il fondamento scientifico occorre rammentare come due siano i principali metodi di burrificazione, quello in uso fra noi, e che consiste nel sottoporre, immantinente dopo la raccolta, la crema all'azione delle zangole; e l'altro, detto comunemente « danese », il quale, oltre che in Danimarca, è usato in grande nell'Australia, e consiste nello aggiungere alla crema del così detto latticello « o siero di burro » inacidito, ossia latticello che ha subito la fermentazione lattica spontanea, ricavato da burro di ottima qualità: attendendo che tutta la crema sia acidificata, per poi sottoporla alle zangole.

I due metodi danno origine a due burri assai differenti per il loro sapore, e il secondo ha un aroma caratteristico e più spiccato del primo. La differenza è poi assai maggiore se si confrontano due burri, uno dei quali sia ottenuto con crema acidificata e l'altro con crema sottoposta alla temperatura di 75°-80° e poi raffreddata, poichè allora il secondo burro è quasi privo di tutto l'aroma. Evidentemente l'aroma del secondo burro è dovuto all'azione di fermenti acidificanti, i quali versano nella crema i prodotti del loro ricambio materiale, mentre

quello del primo deriva esclusivamente dalla qualità del latte onde origina.

Il metodo dell'acidificazione della crema era affatto empirico: le fabbriche danesi, sia nel continente che delle isole, si trasmettevano il latticello inacidito, che cercavano di conservare nella purezza originaria. Ma, alcune volte, accadeva che il latticello si guastava e dava origine a prodotti scadenti, onde la necessità di rinnovarlo. E la scadenza dei prodotti non si esplicava solo nella qualità dell'aroma, ma anche nel grado maggiore o minore di conservabilità. Ciò era evidentemente dovuto al fatto che tra i microrganismi, i quali, cadendo dall'aria, si sviluppavano nel latticello, prendeva il sopravvento qualcuno non adatto, per le sue proprietà biologiche, alla funzione fermentativa.

Fu merito perciò dello STORCH di Copenaghen di avere esaminato i microrganismi fermentativi del latticello, di avere isolato parecchie specie dei medesimi e di avere insegnato ad acidificare la crema, non più con miscugli incontrollati di batteri, ma bensì con culture pure.

Le sue ricerche furono a poca distanza seguite da quelle del WEIGMANN e condussero a riconoscere la presenza di due gruppi di batteri acidificanti; un primo fatto da batteri i quali impartiscono al burro un grosso grado di conservabilità e un sapore puro; e un altro dato da batteri, i quali, mentre procacciano al burro un sapore assai pronunciato ed un aroma finissimo, contribuiscono alla poca durata del prodotto.

I primi appartengono più da vicino ai batteri dell'acido lattico, propriamente detti, nei quali i prodotti secondari sono sempre scarsi; e i secondi invece sono batteri che, oltre acido lattico, danno discrete quantità di alcoli e di acidi grassi superiori. Onde la necessità di mescolare questi due gruppi di fermenti in proporzioni giuste per ottenere un burro che sia nello stesso tempo e aromatico e conservabile.

H. W. CONN aggiunse che i batteri che si riscontrano nei latticelli inaciditi sono straordinariamente molteplici e che è difficile trovare, nei prodotti di due fattorie, gli stessi microrganismi. Ma nè egli nè altri numerosi batteriologi, che di questo argomento si sono occupati, sono riusciti ad identificare completamente questi microrganismi, coi batteri lattici conosciuti: onde è che questa applicazione industriale della fermentazione lattica resta ancora indubbiamente alquanto empirica.

Per lo più gli sperimentatori si sono accontentati di denominare i singoli microrganismi con numeri progressivi; così famoso è rimasto nell'America del Nord uno speciale batterio aromatizzante (il n. 41 del CONN) che però non diede gli effetti sperati. In quanto alle culture del

commercio (che, sia liquide [forse queste sono da preferirsi] che solide, molto spesso lasciano assai ancora a desiderare) è solo noto che contengono degli streptococchi dell'acido lattico e più rare forme di batterii del gruppo del *B. lactis aerogenes*.

Ed inoltre l'esame dei prodotti commerciali fatto da diversi autori ha dati anche risultati diversi.

Che qualche volta tutto il metodo, soprattutto nei riguardi della aromatizzazione della crema, lasci ancora a desiderare non deve meravigliare, perchè non si deve dimenticare come i veri batteri aromatizzanti isolati (non solo dal latte, ma anche da altre sostanze alimentari) tendono molto spesso a perdere in cultura artificiale il loro potere, nè riesce sempre possibile farlo loro riacquistare. Così, a titolo d'esempio, è bene rammentare che sono in questo caso il già nominato bacillo 41 di CONN, il *B. esterificans stralauense* di MAASSEN e il *B. aromaticus lactis* di M. GRIMM. E così pure il *B. esterificans* di HARALD HUSS non ha azione aromatica sulla crema. Per contro il *B. aromaticus butyri* di S. A. SEWERIN (affine ai nominati e inoltre al *Bacterium fragi* di EICHOLZ e alla *Pseudomonas fragariae* del GRUBER) è in caso, non già aggiunto alla crema da acidificare, ma bensì direttamente al burro, di svilupparvi aroma gradevole dopo 2-4 settimane. E da ultimo è noto che i tentativi fatti per l'acidificazione della crema col grano del *kefir* e coi batteri del *mazun* sono rimasti senza successo.

Comunque, e qualunque si siano i batteri impiegati, la burrificazione della crema acidificata avviene nel solito modo, ma si ha il vantaggio di ottenerla in un tempo più breve e con risparmio di mano d'opera e di fatica. Essa è anche più completa dell'ordinario, come risulta da esperienze fatte in Danimarca, e da quanto si è potuto verificare anche in Italia.

A questo riguardo, va notato, però, che, siccome la pasteurizzazione della crema diminuisce di qualche frazione la resa percentuale del burro, avviene che i due fatti si compensano a vicenda.

I risultati concordi ottenuti con questo metodo dallo SPALLANZANI, dal BESANA e dal SARTORI, dimostrano che il burro fatto con questo sistema è certamente più conservabile del naturale e ciò perchè mediante la pasteurizzazione si distruggono i fermenti che possono riuscire nocivi.

Ed è perciò a credersi che ad esso sistema arriderà sempre più sicuro l'avvenire industriale.

Dopo la burrificazione fu la volta della maturazione del formaggio di cadere sotto il dominio dei fermenti selezionati. E qui i tentativi sono più che mai numerosi; onde è necessario accennare a tutti più che brevemente.

Per la preparazione dell'*Emmenthal* le ricerche di V. FREUNDEN-REICH e dei suoi collaboratori, dopo avere trionfato sulle opinioni del DUCLAUX che assegnava la maturazione di molti formaggi al gruppo sporigeno artificiale delle *Tyrothrix*, assegnandola invece al gruppo asporigeno dei batteri dell'acido lattico, hanno portato all'impiego delle culture del *Bacterium casei* e di una specie di *Mycoderma*, aggiunta al momento della coagulazione.

Le ricerche di JENSEN portarono invece all'uso di uno streptococco che cresce bene a 40-50 gr. ed, in date circostanze, anche a quello dei batteri dell'acido propionico. ADAMETZ e WINKLER ebbero buoni risultati, per altro non confermati, col *Bacillus nobilis* e con una sostanza detta « Tirogene » ricavata dalle sue spore.

C. GORINI, coi suoi batteri acido-presamici, inoculati nel latte sterile o pastorizzato, ha dato un metodo di fabbricazione del *Grana* che ora si sta applicando su estensioni abbastanza vaste.

I lavori di THOM hanno condotto alla sostituzione del pane ammuffito per la fabbricazione del formaggio tipo *Roquefort* con culture pure del *Penicillium Roquefortii*, dimostrandosi forse con ciò; che le differenze fra il *Roquefort* e il nostro *Gorgonzola* e gli affini *Stilton* e *Brieze* non dipendono solo dalla tecnica differente che s'impiega per ottenerli, ma anche dalle diverse razze dei Penicilli. Onde, p. es., il *Penicillium aromaticum casei* I O. JOHAN-OLSEN che si può impiegare per la maturazione del *Gorgonzola* non è identico col *Penicillium Roquefortii* THOM.

HÖFELMAYR e W. WINKLER hanno proposto culture pure per il formaggio *Camembert*. Anche G. ROYER e P. MAZÈ hanno proposto e consigliato culture pure per la fabbricazione dei formaggi a pasta molle *Camembert*, la *Brie Coulomniers*. PERNOT selezionò i microrganismi del formaggio *Cheddar*.

O. JOAN OLSEN è riuscito a fabbricare con culture pure il *gammelost* e il *pullost*, formaggi danesi a latte acido, come pure per quelli così detti *Guoda*, e W. WETH ha anche patentato un metodo per la maturazione e la conservazione del formaggio.

Nel complesso si può dire che la maturazione dei formaggi con culture pure è forse ancora bambina ma ha già mosso con sicurezza i primi passi.

L'industria del latte ha anche un altro campo di attività in cui i fermenti selezionati già accennano ad entrare e cioè quella dei « *latte fermentati* » che in alcune regioni d'Europa e d'Asia non hanno scarsa importanza alimentare e ne hanno in Europa una abbastanza considerevole come rimedi in svariate malattie e soprattutto nella tubercolosi ed nei catarrhi cronici del tubo gastro-enterico.

Qui è ancora la fermentazione lattica, mescolata non di rado alla alcoolica ed alla peptonizzazione della caseina, quella che dà origine alle trasformazioni essenziali del latte.

Annoveriamo così dei tentativi per la produzione del « latte pasteurizzato » a mezzo dei fermenti acidificanti che si usano per la burificazione e tendenti o a introdurre tale bevanda nelle abitudini delle popolazioni o a sostituire bevande o cibi già popolari come il *gros-lait* brettone, il *tættemjolk* della penisola scandinava e così via: la *galazina* o latte che ha subito, con o senza aggiunta di saccarosio, la fermentazione alcoolica, il *Joghurt artificiale* fatto colle culture pure dei microrganismi specifici di questo prodotto originante dalla Bulgaria, come quelli dell'*Institut f. Gärungs-gewerbe* di Berlino, la *Milchkonserven mit lebenden Milchsäurebakterien* patentato nella Ditta E. F. BOEHRINGER UND SOHNE e forse anche il *Yoghurt-Käse* dei fratelli GROH di Berlino, il *Kefir* ricavato colle culture pure dei fermenti dei grani di Kefir, quali le patenate *Kefirogentabletten aus Kefirkörnern*, le varie *polveri di Kefir*, il *Kumiss artificiale* preparato dall'EKSTRAND all'Istituto Pasteur, il *Kefir all'acido citrico* secondo APPEL, il *latte spumante all'acido citrico* della « Ditta Adsella » di Berlino, il *Galactonwein* del BERSTEIN, l'alcool di latte, l'aceto di latte e così via.

Dobbiamo ora parlare poi di un'altra e non meno importante (per noi Italiani) applicazione dei fermenti selezionati: e cioè quella all'*industria vinaria*. Per altro, occorre subito dire che la ragione per cui essa non è progredita di più in certi paesi, quali il nostro, è certamente il fatto che nella gran maggioranza dei casi non è stata « *compresa* ».

Da un lato infatti essa suscitò al suo apparire entusiasmo tale che i già ricordati entusiasmi provocati dalla nitragina impallidiscono al confronto: poichè, prendendo troppo alla lettera ciò che aveva scritto il PASTEUR e che cioè il gusto e le qualità di un vino dipendono per una gran parte dalla natura speciale dei saccaromiceti che si sviluppano durante la fermentazione, da molti si credette che bastasse usare, per qualsiasi mosto, un fermento derivante da una vite nobile, per avere del vino nobile. Naturalmente, l'entusiasmo cessò ben presto: e chi fermentò del mosto d'Asprino con fermenti di viti astigiane ottenne ancora:

Quel d'Aversa acido Asprino,
Che non sai s'è agresto o vino.

Onde questo primo passo, che si sarebbe ridotto esclusivamente ad usare culture pure in luogo dei fermenti naturali, fece tosto cadere in discredito la pratica nonostante i sensibili vantaggi che sempre si otten-

gono in ordine alla fermentazione, alla chiarificazione, alla maturazione, all'armonia dei diversi componenti, alla serbevolezza ed al calore.

D'altro lato poi, nè subito, nè poi, è stato ancora universalmente compreso che l'usare le culture pure non è ancora selezionare il fermento, per quanto le esperienze non lascino più alcun dubbio che la selezione del fermento, ossia, come ben sappiamo, la scelta metodica del fermento più adatto per un dato mosto, è d'importanza massima per determinare il carattere di un vino. Le esperienze di CESARE FORTI, quelle di EDMONDO KAYSER (per cui un mosto di Aramon, trattato con fermento Chablis, fu preso per Chablis), quelle di ENRICO PANTANELLI per cui un mosto di Noto in Sicilia, a seconda del fermento, diede quantità variabili d'alcool dal 10 al 15 per cento; non lasciano più alcun dubbio in proposito.

Non comprendendosi l'importanza del concetto fondamentale e dominando invece scetticismo e sfiducia, la selezione non potè ancora essere fatta, onde è certo che siamo ancora, come dicemmo, ai primi passi. Ma oramai, soprattutto coll'introduzione dei metodi di *vinificazione* così detta *al bisolfito* (ossia coll'usare fermenti adattati a sopportare forti dosi di anidride solforosa) che colla sterilizzazione chimica che inducono nel mosto permettono il facile sopravvento dei lieviti introdotti artificialmente sui naturali e rendono inutili le non sempre pratiche e spesso dannose sterilizzazioni al calore, è sperabile che rimedieremo presto al tempo perduto. E nonostante che qualche incertezza teorica domini ancora e cioè, per quanto sia ancora oscuro se convenga, sempre ed in ogni caso, usare, per un dato mosto, fermenti artificiali, ricavati e selezionati dai naturali del mosto stesso, se esistono fermenti « nobili » derivanti dalle viti di prima qualità e capaci di influenzare sensibilmente qualsiasi qualità di mosto, se si debbono o no scartare in ogni fermentazione i fermenti naturali e se veramente il *bouquet* di un vino sia, come vuole ROSENSTIEHL, la combinazione di un lievito antogeno sulle sostanze antofore del mosto, ciononostante, dico, è certo che ben presto i fermenti selezionati, applicati alla vinificazione, daranno sempre ed in ogni caso i vantaggi che hanno già dato in alcuni pochi, come, p. e., nella fabbricazione degli spumanti.

E del resto vi sono, oggi, delle manifestazioni economiche che non sono più comprensibili che mediante l'uso dei fermenti selezionati, in prima linea delle quali sta la fabbricazione dei vini a tipo unico, soprattutto quale è richiesto dagli sforzi del cooperativismo e della così detta « vineria » del BARBET.

Dei fermenti selezionati nell'industria della birra già parliamo: ora aggiungeremo soltanto che se attualmente è un vero plebiscito da parte

dei direttori delle fabbriche di birra europee, americane, asiatiche ed australiane, in pro del metodo di HANSEN, è anche interessante rammentare, che se il sistema dell'HANSEN, avendo prese le mosse dalle fermentazioni basse, trovò in queste la sua applicazione senza difficoltà, molta maggior fatica fece per penetrare nella fabbricazione della birra a fermentazione alta, e che se, ben presto, in Danimarca e in Germania, soprattutto per opera di JOERGENSEN e di SCHÖNFELD e di molti altri, la battaglia fu vinta, non così fu per le fabbriche inglesi le quali furono affatto restie ad introdurre il nuovo metodo, soprattutto per le birre alte: e quello che i fabbricanti inglesi obiettavano soprattutto, era che essi non credevano che una sola razza di lievito fosse in caso di condurre a termine la fermentazione alta principale e la secondaria. E infatti, nonostante che l'HANSEN in persona si recasse in Inghilterra a spiegare, con conferenze, il suo metodo, questo fu abbandonato e nemmeno gli studii e le proposte del VAN LEER di adoprare, per l'Inghilterra, un lievito misto, formato di due razze, fu capace di risollevarlo il metodo.

La chiave del mistero forse fu data da HJALMAR CLAUSSEN il quale fece vedere che le birre inglesi alte (notoriamente differenti dalle tedesche per odore e sapore, e, per possedere una forte quantità di spuma a fine bolle, appena affini a qualche birra belga) devono la loro fermentazione secondaria ad una speciale *Torula* (egli la chiamò *Brettanomyces*) che è perfettamente in caso, aggiunta artificialmente al lievito principale puro, di impartire alla birra i dovuti caratteri specifici della birra inglese.

Onde questa vittoria è addirittura la conferma finale della « bontà » del metodo della selezione delle specie efficaci.

La fermentazione alcoolica coi fermenti selezionati trova poi un grande altro impiego nella *fabbricazione industriale dell'alcool* dalle più svariate materie, dalle patate, dalle melasse, dal granone, dall'orzo e perfino dal siero di latte: qui si fanno agire fermenti adattati alla speciale materia prima, e quando questa non si può sterilizzarla, allora si può impiegare il metodo di EFFRONT all'acido fluoridrico, pratica che corrisponde alla vinificazione al bisolfito, in quanto con essa si fanno agire saccaromiceti selezionati adattati a sopportare alte dosi di un potente antisettico quale è l'acido fluoridrico.

Oltre che nella fermentazione alcoolica propriamente detta, l'industria dell'alcool utilizza i fermenti selezionati anche nella saccarificazione delle materie prime: e più propriamente le proprietà del micelio di speciali *Mucor* (il principale è il *Mucor amylomyces Roncii* del CALMETTE, con le sue varietà α , β e γ) di trasformare rapidamente l'amido solubile in maltosio. Nel metodo BOLDIN e COLETTE tutte le operazioni si fanno

previa rigorosa sterilizzazione del materiale e quindi con culture batteriologicamente pure.

E quando il *sakè*, la *chicha*, la *soja*, il *schium-schium*, l'*arak* e le altre bevande orientali analoghe, acquisteranno maggiore importanza commerciale anche per l'Occidente, le culture pure degli altri *Mucor* e degli *Aspergillus* che la micetologia ha riconosciuto come agenti attivi dei lieviti impuri che, come il *kokii*, il *men*, il *raggi*, attualmente producono in Oriente tali bevande, tali culture, dico, saranno pronte per sostituirli con non indifferenti vantaggi.

Altre applicazioni dei fermenti selezionati sono ancora le seguenti:

1) La fabbricazione del *sauekraut* colle culture pure della *Pseudomonas brassicae acidae* di T. H. GRUBER, raggiungendosi così maggior celerità nel processo, maggior sviluppo di aroma e maggior tenerezza di prodotto.

2) L'acidificazione delle birre che devono avere gusto di acido lattico colle culture pure dei fermenti lattici (e soprattutto del *B. acidificans longissimus*).

3) La fabbricazione del pane coi lieviti alcoolici come ora si pratica quasi dappertutto a mezzo di lieviti compressi, che alla lor volta possono essere fabbricati coi lieviti selezionati.

4) L'acetificazione industriale colle culture pure dei batterii acetici, forse la pratica meno avanzata come applicazione, nonostante i molti risultati teorici avuti.

5) La fermentazione del tabacco colle culture pure, secondo i brevetti di SUCHSLAND.

6) La fabbricazione dell'acido citrico coi *Citromyces*.

7) La fermentazione dell'oppio con culture pure di *Aspergillus niger*.

8) L'uso di culture pure in tanneria, rappresentate soprattutto dall'Erodina, cultura pura di *Bacillus erodiens*, a sostituzione delle ineliminabili materie fin qui usate.

Da questa rapida ed incompleta rivista dello stato attuale delle varie applicazioni dei « fermenti selezionati » all'industria ed all'agricoltura, parmi si possa ricavarne a buon dritto l'ammaestramento che essi sono destinati ad essere, in tutti i campi in cui si richiede l'attività microbiologica, i metodi dell'avvenire.

Qualora avremo completate le nostre conoscenze sui molti punti ancora oscuri della microbiologia e soprattutto quando avremo perfezionato i metodi di sterilizzazione nel senso di avere delle sterilizzazioni, totali o parziali sicure, costanti ed economiche, e nello stesso tempo tali da non togliere al substrato le sue proprietà fondamentali ed alterarlo

troppo, potremo, con maggior sicurezza, « scegliere » la migliore e più adatta delle « culture pure » ed usarla così « selezionata », per il fine propostoci.

Però, nella maggior parte delle volte, noi non dovremo pretendere che coll'impiego delle culture pure e selezionate si ottenga « meglio e più » di quello che i processi fermentativi naturali, quando decorrono normalmente, sono in caso di darci: mentre dovremo essere molto spesso paghi di raggiungere la sicurezza e la costanza del rendimento.

Noi non sappiamo sempre come la natura proceda per ottenere l'azione di una data specie in un dato substrato a detrimento di qualsiasi altra: non è anzi escluso che, molto spesso, essa invece agisca per mezzo dell'azione simultanea o successiva di più specie: onde è anche a credersi che, in un avvenire più o meno prossimo, il concetto della cultura pura, capace di compiere da sola una intera operazione industriale o adempiere da sola una funzione agraria, sia sostituita (e qualche accenno già l'abbiamo veduto) da quello della « esatta riproduzione artificiale » dell'intero processo naturale. Ma ciò non è a temere possa costituire un regresso. Man mano che la cerchia delle nostre conoscenze si allarga e man mano che i veli, più densi e più spessi dei setti veli che coprono il simulacro d'Iside, si allontanano dai misteri della natura, è tutto un progresso lento, ma sicuro, verso la verità, perchè la scienza non subisce « arresti » e non fa « bancarotta »: e lo scienziato non deve temere di avere errato solo perchè vede cadere ad un tratto dei dogmi, inattacabili soltanto nella sua fantasia. Occorre invece avere cieca fede nella scienza e nel suo potere e tenere costantemente presente che la natura è maestra insuperabile, onde il compito nostro è di guidarla ove essa tende il più che da noi si possa: anche la sapienza antica aveva detto: che *quo natura pergit eo ducenda est!*

