



Misc. B. 49. 50

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

DI ALCUNE NUOVE PROPRIETÀ

DELL'O

SPIRILLO COLERIGENO DI KOCH

E DEGLI

SPIRILLI AFFINI DI METSCHNIKOFF, DI FINKLER

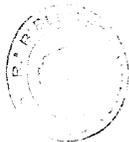
E DI DENEKE

NOTA

DEL

DOTT. ACHILLE SCLAVO

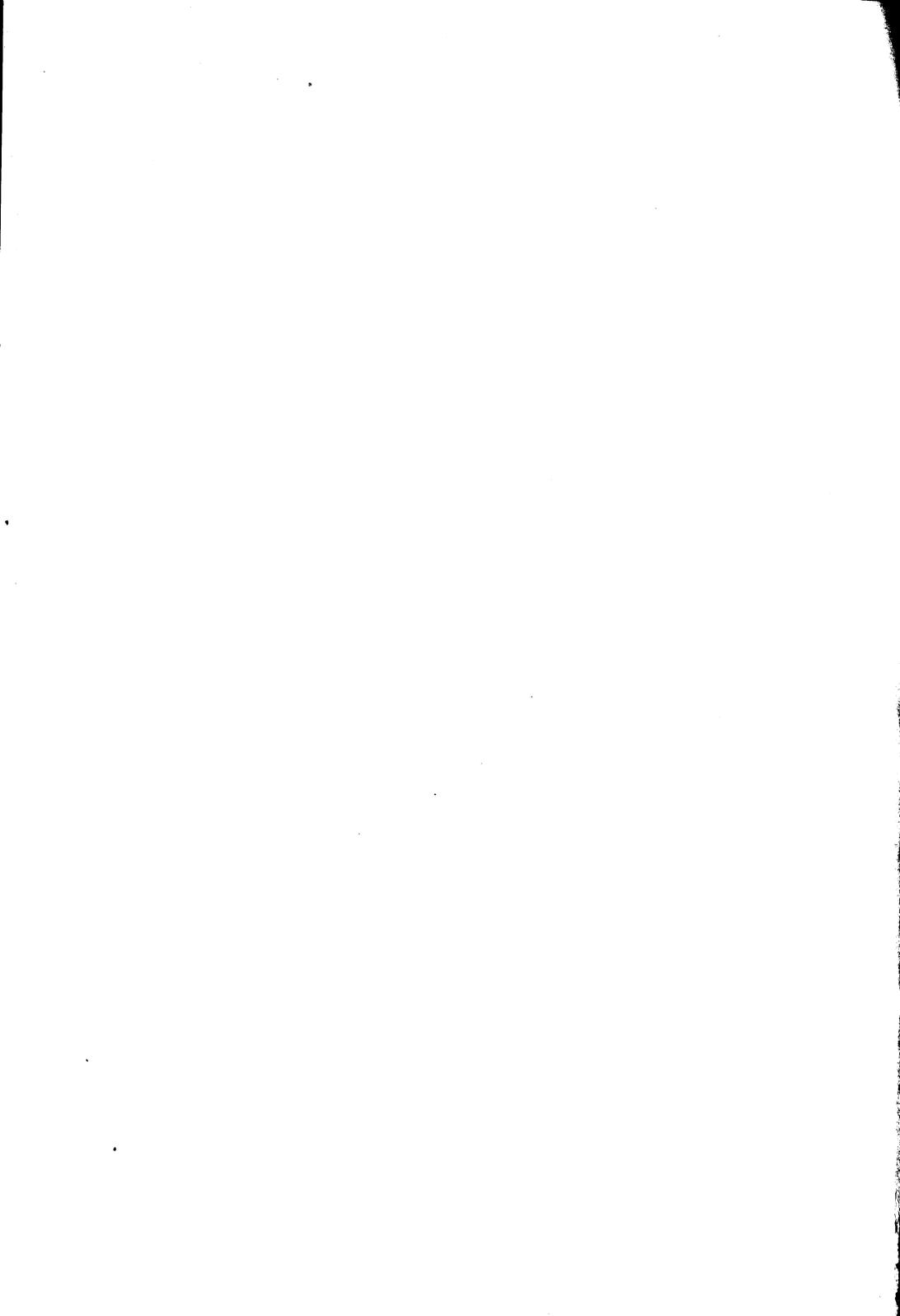
REGGENTE IL LABORATORIO BACTERIOLOGICO
DELLA DIREZIONE DI SANITÀ



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1892



MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

DI ALCUNE NUOVE PROPRIETÀ

DELLO

SPIRILLO COLERIGENO DI KOCH

E DEGLI

SPIRILLI AFFINI DI METSCHNIKOFF, DI FINKLER

E DI DENEKE

NOTA

DEL

DOTT. ACHILLE SCLAVO

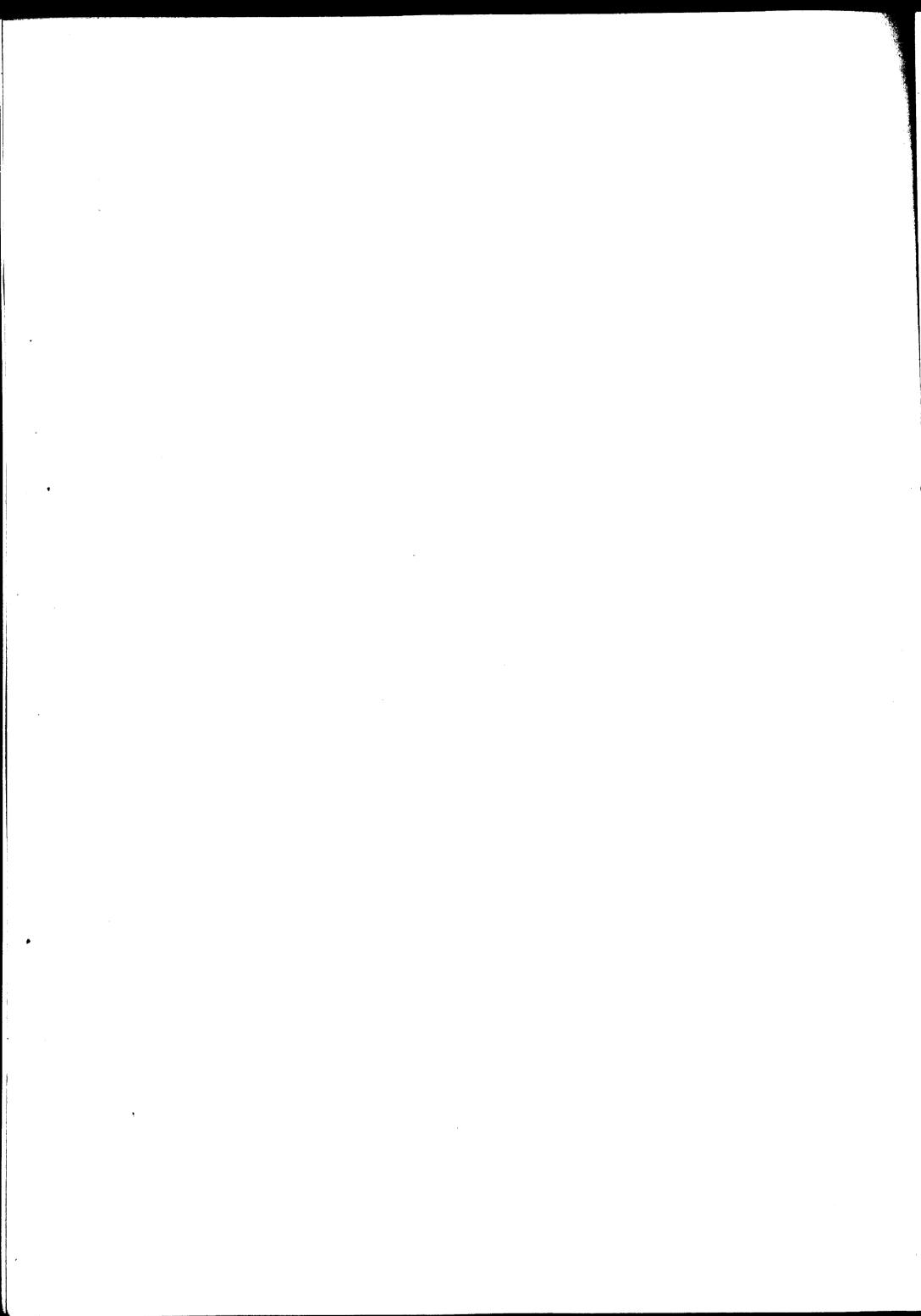
REGGENTE IL LABORATORIO BACTERIOLOGICO
DELLA DIREZIONE DI SANITÀ



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1892



DI ALCUNE NUOVE PROPRIETÀ
DELLO
SPIRILLO COLERICENO DI KOCH E DEGLI SPIRILLI AFFINI DI METSCHNIKOFF
DI FINKLER E DI DENEKE

NOTA

del dott. **ACHILLE SCLAVO**
reggente il laboratorio batteriologico della Direzione di Sanità

Di una serie di ricerche sul potere inversivo dei batteri e sulla utilizzazione dell'alimento idrocarbonato da parte loro, pubblico per ora quelle esperienze che io ho istituito con lo spirillo colericeno di Koch e con gli spirilli affini di Metschnikoff, di Deneke e di Finkler.

Mentre è dimostrato che diverse specie di blastomiceti e di ifomiceti godono della proprietà di trasformare il saccarosio in destrosio e levulosio, sono poche le notizie, che possediamo, circa al potere inversivo degli schizomiceti (1).

In una memoria pubblicata nel 1888 dai signori Manfredi, Boccardi e Iappelli (2) è riportata una serie di esperienze con cui si mette in evidenza la parte che i microrganismi (senza designazione di specie) prendono nei fenomeni inversivi, che hanno luogo nel tubo gastroenterico del cane e del coniglio.

(1) *Die Mikroorganismen*. FLÜGGE, pag. 469.

(2) « Sul fermento inversivo nell'organismo animale ». Ricerche fisiobatteriologiche dei dott. MANFREDI, BOCCARDI e IAPPELLI. - *Giornale internazionale delle scienze mediche*. Anno X.

Con qualche particolare venne dal dott. Vignal (1) studiata l'attività inversiva del bacillo *mesentericus vulgatus*.

La monografia di tale autore accenna però assai scarsamente alla tecnica di preparazione del materiale nutritivo; ritengo io invece conveniente riportarla qui in esteso quale fu da me seguita.

*

Il saccarosio purissimo necessario per lo studio dei fenomeni inversivi si può ottenere facilmente dallo zucchero in dadi del commercio, sempre commisto a piccole quantità di zucchero invertito.

Si fa di tale zucchero, finissimamente polverizzato, una soluzione concentratissima in acqua scaldando a bagno maria; alla soluzione raffreddata si aggiunge in eccesso alcool assoluto, privo di sostanze riducenti, con che si ottiene un precipitato di saccarosio, mentre restano in soluzione le tracce di zucchero invertito; si filtra, si lava con alcool assoluto, si asciuga fra carta bibula e si completa l'essiccamento tenendo lo zucchero in un essiccatore, in cui si rarefà l'aria per mezzo di una pompa ad acqua.

Se il saccarosio così purificato viene lasciato liberamente esposto all'aria atmosferica, ben presto in piccola parte si invertisce per effetto dei microrganismi, specialmente delle muffe e dei blastomiceti, che dall'aria si depositano sulle masse cristalline.

Per evitare ciò, accettando l'indicazione dei dottori Manfredi, Boccardi e Iappelli (2), si tenga a permanenza il saccarosio nell'essiccatore, dove la mancanza di umidità impedisce lo svolgersi di qualunque attività vitale.

Per quanto riguarda il materiale nutritivo azotato, dopo alcune prove, ho scelto il *brodo semplice*, che ottengo dall'infuso di carne (preparato di fresco) tenendolo per un'ora nella pentola di Koch, alcalinizzandolo quindi leggerissimamente, ed esponendolo poi ancora per un'altra ora alla corrente di vapore prima di filtrarlo.

Al filtrato ho aggiunto il saccarosio nella proporzione del 5 % e qualche volta, come sarà detto, solamente in quella del 2 %.

Ho sempre sterilizzato il brodo così zuccherato nella pentola di Koch.

(1) *Contribution à l'Etude des bactériacées*, par WILLIAM VIGNAL, Paris, 1889.

(2) *Ibidem*, pag. 16 dell'estratto.

Tra i reattivi, che valgono a riconoscere lo zucchero invertito in presenza di saccarosio, ho dato ordinariamente la preferenza al liquido di Nylander (1).

La ricerca dello zucchero invertito si fa aggiungendo, in una provetta piuttosto stretta, a circa 10 cmc. di brodo un cmc. di reattivo, ed esponendo alla fiamma la parte alta della colonna liquida per farla bollire. Per la presenza di zucchero invertito si ha così ingiallimento degli strati superiori della colonna, che si fanno poco a poco di tinta più carica fino a diventar neri se lo zucchero riduttore è in discreta quantità.

Operando in tal modo sono riconoscibili anche tracce di zucchero invertito per il paragone che si può fare tra la tinta del brodo primitivo nella parte bassa della provetta e quella del brodo riscaldato con il reattivo nella parte alta.

Dalla intensità dell'imbrunamento del brodo e dalla rapidità con cui la reazione si compie si può giudicare, con una certa approssimazione, della quantità presente di zucchero invertito.

Nei casi dubbi ho praticato anche la ricerca con la seguente prova proposta da Rubner e modificata da Penzoldt. A 6-7 cmc. di brodo si aggiungono alcune gocce di ammoniaca concentrata e poscia uguale quantità circa di acetato basico di piombo. Se si scalda allora la provetta a bagno maria verso gli 80°-90°, il precipitato bianco, che si è prima formato, si tinge in rosso-carnicino, per la presenza di zucchero invertito. Tale reazione è ritenuta come sicura e sensibile (2).

*

Ho iniziato lo studio delle proprietà inverse dei batteri coll'inoculare tubi di brodo zuccherato, che ho mantenuti alla temperatura di 37°, e saggiandoli di tempo in tempo con il reattivo di Nylander.

(1) Questo reattivo si prepara nel seguente modo:

Quattro grammi di sali di Seignette si sciolgono in 400 cmc. di una soluzione di soda al 40 %; si aggiungono 2 grammi di solfonitrato di bismuto e si digerisce a bagno maria per circa un'ora, con che si scioglie una gran parte del sale di bismuto. Si lascia in riposo il liquido per 24 ore e si decanta la parte limpida in una bottiglia gialla, dove il reattivo si mantiene inalterato. — *Lehrbuch der Physiologischen Chemie-Hanamarsten*, pag. 343.

(2) *Lehrbuch der chemischen Untersuchungsmethoden zur Diagnostik innerer Krankheiten*. Wesener, pag. 421.

Il materiale per le inoculazioni è sempre stato preso da culture in agar.

Nelle esperienze fatte in queste condizioni con lo spirillo di Koch, di Metschnikoff, di Deneke e di Finkler riconobbi ben tosto che di essi solamente i due primi manifestavano proprietà inverse. Nel ripetere però le prove per precisare meglio le condizioni in cui il fenomeno avveniva, mi accadde talvolta di non potere ritrovare nelle culture dello spirillo di Koch e di Metschnikoff gli effetti inversivi di prima.

Nei numerosi tentativi fatti per ricercar la causa di ciò, avendo io saggiato con cartine sensibilissime di tornasole la reazione dei vari brodi zuccherati, rilevai che in ogni caso essa si era fatta spiccatamente acida per le culture dello spirillo colerigeno di Koch, di Metschnikoff e di Finkler.

Nelle culture dello spirillo di Deneke invece non si aveva intorbidamento manifesto dei brodi, i quali conservavano pure la primitiva alcalinità.

Nell'ipotesi che lo sviluppo di questo saprofito fosse stato ostacolato dalla temperatura di 37°, ho ripetuto gli innesti lasciando i tubi in un ambiente dove la temperatura non saliva mai al di sopra dei 26°, nè scendeva al di sotto dei 18°.

In tali condizioni il bacterio si sviluppò abbondantemente nel brodo zuccherato, il quale in capo a due giorni circa aveva acquistata una distinta acidità.

Noto di passaggio che questa facoltà di acidificare i brodi zuccherati è propria di moltissimi bacteri ma non di tutti, così p. es., per limitarmi agli spirilli, non acidifica affatto detti brodi lo *spirillum rubrum*.

La comparsa nei brodi zuccherati di un'acidità che si sa così nociva ai quattro bacteri oggetto di studio, mi offriva intanto attacco per spiegare l'incostanza dei risultati ottenuti nelle prove sulla inversione.

Era a supporre che la sopravvenuta acidità fosse di impedimento allo esplicarsi delle diverse attività dei bacteri, le quali, tanto più presto sarebbero state paralizzate quanto più prontamente l'acidità si fosse stabilita. Ammesso che lo spirillo di Koch e quello di Metschnikoff avessero realmente proprietà inverse e che i brodi adoperati possedessero diverso grado di alcalinità, doveva, *coeteris*

paribus, l'effetto inversivo dei batteri rendersi manifesto assai più facilmente nei brodi con reazione inizialmente più alcalina, riuscendo questa a neutralizzare maggiore quantità degli acidi formati dai batteri.

Poteva anche la comparsa dell'acidità impedire di riconoscere le proprietà inverse dello spirillo di Deneke e di Finkler qualora queste si spiegassero con minore intensità e con minore prontezza.

Era utile intanto di conoscere fino a qual punto venissero danneggiati i batteri dai prodotti del loro ricambio, e perciò ho inoculato una serie di tubi di brodo zuccherato con i quattro spirilli, li portai nel termostato a 37°, tenendo solamente alla temperatura dell'ambiente lo spirillo di Deneke. Fatti nei giorni successivi trasporti con l'ansa di platino in tubi di brodo di Loeffler, vidi che alla 7^a-8^a giornata tali trasporti riuscivano ordinariamente sterili per lo spirillo di Koch, di Metschnikoff e di Finkler; più a lungo si manteneva in vita lo spirillo di Deneke giacché lo sviluppo di esso si potè di solito constatare anche dopo 18-20 giorni.

Io non intendo stabilire date precise che segnino la morte dei batteri, giacché questa in alcuni esperimenti seguì con ritardo di qualche giorno, ma semplicemente voglio enunciare il fatto che nei brodi zuccherati i prodotti del ricambio uccidono rapidamente lo spirillo di Koch, di Metschnikoff e di Finkler, meno prontamente lo spirillo di Deneke.

Credo molto interessante per la diagnosi differenziale dei batteri riferire il reperto microscopico di questi brodi zuccherati in cui la vita va gradatamente affievolendosi.

Facendo a gocce pendenti l'esame dei brodi, inoculati da 24-36 ore, si nota che lo spirillo di Koch non ha più il caratteristico movimento, gli elementi stanno quasi tutti inerti, solo pochi si muovono ancora con agilità nel campo del microscopio.

Il bacterio ha perduta l'ordinaria sua forma a virgola formando corti filamenti variamente ripiegati, in cui si scorgono punti splendidi, prima espressione forse di degenerazione.

Per gli spirilli di Metschnikoff e di Finkler il movimento va pure cessando nello stesso modo che per lo spirillo colerigeno, ma mentre il primo di essi si presenta ricurvo come d'ordinario, senza fornire filamenti, lo spirillo di Finkler invece ha assunto

un caratteristico aspetto rotondeggiante come di cocco; riprende la forma di vibrione se è riportato in brodo senza zucchero.

All'esame dei brodi dove fu inocolato lo spirillo di Deneke si trovano lunghi filamenti ondulati, i quali nei primi giorni conservano un attivo movimento.

*

Compite queste ricerche preliminari che mi dimostrarono il vario modo di comportarsi degli spirilli nel brodo zuccherato, per mettere in evidenza il loro potere inversivo ho tentato due vie.

Mi sono servito di brodi zuccherati fortemente alcalini allo scopo di difenderli per un certo tempo dall'azione degli acidi, oppure ho aggiunto ai brodi sostanze più o meno solubili, capaci di entrare in combinazione con gli acidi di mano in mano che questi si formavano neutralizzandoli.

*

I brodi fortemente alcalini tenuti a 37° furono intorbidati dagli spirilli di Koch, di Metschnikoff e di Finkler e lasciati limpidi dallo spirillo di Deneke, il quale invece si sviluppò bene alla temperatura ambiente.

Dopo 36-48 ore dall'innesto per le colture degli spirilli di Koch, di Metschnikoff, di Finkler la reazione accennava già a passare all'acidità, il che pure avvenne, ma con maggiore lentezza, per i brodi intorbidati dallo spirillo di Deneke.

Intanto dopo 48-60 ore l'inversione era ordinariamente già iniziata nelle colture degli spirilli di Koch e di Metschnikoff, mancò per lo spirillo di Finkler, anche se ricercata dopo 7-8 giorni, verso il qual tempo cominciò a manifestarsi in leggiero grado nel brodo con spirillo di Deneke.

*

Per salificare gli acidi formati dai batteri nel brodo zuccherato ho adoperato il carbonato di calcio in polvere finissima.

In una boccetta di Erlenmeyer aggiungevo il carbonato di calcio al brodo, agitavo, distribuivo il liquido intorbidato in provette di dimensioni piuttosto grosse e sterilizzavo come di solito alla corrente di vapore acqueo.

Dopo alcune esperienze avendo notato che il carbonato di calcio raccolto al fondo delle provette offriva poca superficie agli acidi del brodo, talché questi si accumulavano ancora allo stato libero nel materiale nutritivo, chiusi le provette alla lampada 24 ore dopo l'innesto, ne agitai bene il contenuto e le conservai poscia in posizione orizzontale. Ebbi così dalle culture filtrate degli spirilli di Koch e di Metschnikoff (tenute a 37°) distinta la reazione dello zucchero invertito, di solito già in capo a 36-48 ore, quando specialmente curai di agitare a quando a quando le provette, sollevando nella massa del brodo il carbonato di calcio, che ha tendenza a formare uno straterello aderente sul vetro. Mancò invece questa reazione nel liquido filtrato delle culture dello spirillo di Finkler. Lo spirillo di Deneke, solamente alla temperatura dell'ambiente, riuscì in 3-4 giorni ad invertire in mediocre grado il saccarosio.

Dovetti però avvertire che colla presenza del Ca CO_3 non vengono salificati del tutto gli acidi del brodo e dopo alcuni giorni si trova in essi una acidità *fissa* abbastanza spiccata, tale da uccidere ancora i bacteri, come potei in un caso verificare facendo trasporti in brodo di Loeffler di culture di colera vecchie di soli 15 giorni.

Del resto la polvere di marmo, salificando anche solo in parte gli acidi prodotti, mette in libertà dell'anidride carbonica, la quale, se è meno nociva per lo spirillo di Finkler, spiega un'azione spiccatamente venefica sugli spirilli di Koch e di Deneke (1).

Per queste ragioni, in altre esperienze ho sostituito al carbonato di calcio l'ossido di magnesio. Tale sostanza pur rimanendo in gran parte allo stato insolubile impartisce ai brodi una reazione fortemente alcalina, di cui però trionfano i bacteri.

Talora veramente rimangono sterili o si intorbidano con ritardo i brodi inoculati con gli spirilli di Koch e di Finkler, ma ciò non succede se si ha l'avvertenza nell'innesto di trasportare in essi con ansa di platino abbondante materiale e giovane.

Se si conservano le provette, chiuse alla lampada, nella stufa a 37°, mentre non havvi sviluppo dello spirillo di Deneke, si vede

(1) « Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebensthätigkeit der mikroorganismen », C. FRAENKEL. - *Zeitschrift für Hygiene*, Vol. V, pag. 355.

per gli altri bacteri che in capo a 2-3 giorni è notevolmente disciolto il deposito di ossido di magnesio.

La reazione si mantiene alcalina finchè resta nei brodi di tale ossido, che se questo, per essere in piccola quantità, viene presto e del tutto salificato, allora compare la reazione acida.

Gli spirilli di Koch e di Metschnikoff traendo intanto grande beneficio dall'azione fortemente neutralizzante dell'ossido di magnesio riescono a spiegare meglio il loro potere inversivo e dopo due giorni in media si ottiene dalle loro culture con il reattivo di Nylander una abbondantissima riduzione del sale di bismuto.

Lo spirillo di Deneke alla temperatura dell'ambiente, riesce pure ad invertire, sebbene in grado molto minore, il saccarosio, e le stesse culture dello spirillo di Finkler dopo 4-5 giorni danno con il reattivo di Nylander un leggiero ingiallimento che non ottenni mai molto accentuato, neanche da culture vecchie di 10-12 giorni.

Si ha dunque così un mezzo di riconoscere gli spirilli di Koch e di Metschnikoff da quelli di Finkler e di Deneke per il diverso potere inversivo, assai più forte nei primi che nei secondi e di distinguere fra loro questi ultimi per la diversa condizione di temperatura in cui tal potere si esplica.

*

Con la comparsa dell'acidità nei brodi zuccherati non solamente vien ostacolato il fenomeno dell'inversione, ma in maggiore o minor grado restano sospese ben presto le diverse attività dei bacteri.

Gli spirilli di Koch, di Metschnikoff e di Finkler inoculati in brodo semplice e tenuto a 37° si sviluppano rigogliosamente ed i due primi formano circa dopo 36-48 ore un'abbondante pellicola nel liquido.

Orbene, se ripetiamo le prove con brodo semplice addizionato di saccarosio nella proporzione del 5% o anche solo del 2% l'intorbidamento del liquido avviene con eguale se non con maggiore prontezza; ma la moltiplicazione dei bacteri si arresta ad un certo punto e la pellicola più non si forma sui brodi.

In modo assai diverso decorrono i fenomeni per lo spirillo di Deneke.

Inoculato nel brodo semplice e tenuto alla temperatura dell'ambiente, esso non vi si sviluppa che con lentezza e scarsamente,

creosce invece meglio e più prontamente nel brodo con saccarosio (2-5 %) dando luogo alla formazione di una pellicola costituita da spirilli dotati per i primi giorni di vivace movimento.

L'alimento idrocarbonato ha dunque favorito la vita del bacterio di Deneke come forse favorisce in un primo tempo quella degli altri spirilli.

Saggiando per alcuni giorni con le carte di tornasole l'acidità nei brodi zuccherati inoculati con lo spirillo di Deneke, si trova che essa è molto minore che non in quelli dove da pari tempo hanno vissuto gli altri tre spirilli.

In ciò sta pure in parte la spiegazione dell'abbondante sviluppo che può raggiungere lo spirillo di Deneke nei brodi zuccherati.

Riassumendo si può dunque dire che nei brodi con saccarosio inoculati con gli spirilli di Koch, di Metschnikoff e di Finkler non si ha mai la comparsa di pellicola, la quale si forma invece bene in quelli in cui si coltiva lo spirillo di Deneke.

*

Gli spirilli di Koch e di Metschnikoff coltivati nel brodo di Loeffler vi formano indolo e acido nitroso, talchè, per l'aggiunta di un acido minerale, p. es. di acido solforico, si manifesta una colorazione rossa poco intensa se si tratta di culture giovani, più carica se queste sono vecchie.

Poichè anche nel brodo di Loeffler, addizionato di saccarosio (2 %), compare presto la reazione acida se in esso si inoculano i due spirilli, ho ricercato con una serie di prove comparative quale influenza spieghino tali acidi sulla formazione dell'indolo e dell'acido nitroso.

Ecco il risultato:

La reazione del rosso si ottiene tanto dal brodo di Loeffler quanto da quello addizionato di saccarosio, però *la tinta nei brodi inoculati da 36 ore circa è sempre meno carica nei brodi zuccherati nè si ottiene maggiormente accentuata dalle colture più vecchie (8-10 giorni).*

*

Dimostrata così sperimentalmente l'influenza grande, che esercitano sulla biologia dei quattro spirilli gli acidi formati dalla

scomposizione dello zucchero di canna, volli ricercare se tale produzione di acidi avvenisse ancora quando altro alimento idrocarbonato fosse offerto ai batteri.

Ho istituito perciò una serie di esperienze con brodo semplice leggermente alcalinizzato, cui aggiunsi glucosio o lattosio nella proporzione del 2 %.

Le culture furono tenute a 37°; lo spirillo di Deneke solamente fu fatto sviluppare alla temperatura dell' ambiente.

Riassumo qui sotto i risultati delle diverse esperienze:

1° *Il glucosio viene utilizzato dai quattro spirilli con formazione di acidi; così pure è, ma in minor grado, del lattosio, anzi con questo lo spirillo di Deneke non riesce ad impartire ai brodi una reazione decisamente acida (1).*

2° *Nel brodo con glucosio (2 %) soltanto lo spirillo di Deneke riesce a formare la pellicola.*

3° *Corrispondentemente alla minore quantità di acidi che producono dal lattosio gli spirilli di Koch e di Metschnikoff nei brodi addizionati di questo idrato di carbonio (2 %) danno luogo qualche volta alla comparsa di una sottile pellicola, specialmente se le culture furono tenute in perfetto riposo.*

4° *Lo spirillo di Deneke non si giova molto della presenza nel brodo del lattosio giacchè spesso in tali condizioni non riesce a determinare intorbidamento di sorta, che se questo ha luogo, dopo alcuni giorni è seguito dalla comparsa di una sottile pellicola sul liquido.*

*

Il comportamento degli spirilli nei brodi con lattosio, mi indusse a vedere se questo idrato di carbonio nel latte fosse allo stesso modo scomposto dai batteri.

Già Kitasato (2) aveva osservato che le culture dello spirillo di Koch in latte sterilizzato e tenuto a 36° passavano dopo una

(1) Mentre stava pubblicandosi la presente memoria mi venne fatto di leggere del N. 44 della *Semaine Médicale* (31 agosto 1892) una breve comunicazione del dott. M. J. Ferran alla Accademia delle scienze di Parigi, in cui l'autore dice di avere notato l'acidimento del brodo addizionato di lattosio per opera dello spirillo colerigeno.

(2) « Das Verhalten der Cholerabacterien in der Milch ». *Kitasato, Zeitschrift für Hygiene*. Vol. V, pag. 475.

settimana dalla reazione anfotera a quella acida senza che avvenisse coagulazione del latte.

Secondo Hüppe (1) « lo spirillo di Deneke, agendo come un presame, precipita la caseina del latte e lo spirillo di Finkler in modo più intensivo produce la stessa cosa, peptonizzando poi la caseina in quella guisa come farebbe un fermento tripsinico. Sulla crema lo spirillo di Deneke forma un pigmento giallo zolfo ».

Mentre, servendomi di latte munto di fresco e sterilizzato (4 ora) alla pentola di Koch, ho potuto confermare l'osservazione di Kitasato, debbo dire che lo spirillo di Deneke non diede mai luogo alla formazione di un vero coagulo; parmi assai caratteristica la comparsa del pigmento giallastro sul latte inoculato da 8-9 giorni circa con questo spirillo; tutta la massa anzi del latte verso quel tempo assume uno speciale colorito giallastro e sembra abbia perduto in opacità.

Nelle culture dello spirillo di Finkler si notò di solito al 6°-7° giorno come una deposizione di tutte le parti sospese nel latte, bastava però agitare il liquido perchè esso talvolta riacquistasse quasi l'aspetto di latte ordinario.

A differenza degli altri tre spirilli, quello di Metschnikoff produce nel latte in capo a 6-7 giorni un coagulo mediocrementemente compatto (2).

Sottoposta a prova la reazione dei tubi di latte inoculato con gli spirilli di Metschnikoff, di Finkler (37°) e di Deneke (temperatura ambiente), trovai che essa era anfotera ancora al 12° giorno, dove aveva vegetato lo spirillo di Deneke, mentre gli spirilli di Finkler e di Metschnikoff dopo 6-7 giorni dall'innesto avevano determinato la comparsa di una acidità bene riconoscibile.

Dubitando che tale acidità non fosse estranea alle visibili modificazioni che i due ultimi spirilli inducono sul latte, ho pensato di renderla più spiccata aggiungendo al latte, che doveva servir di cultura, del saccarosio (5^o/₁₀₀), il quale, come risultavami dalle esperienze fatte coi brodi, viene con maggior facilità dagli spirilli trasformato in acidi.

(1) « Ueber Fortschritte in der Kenntniss der Ursachen der Cholera Asiatica », *Berliner klinische Wochenschrift*, 1887, pag. 140.

(2) « Vibrio Metschnikovi ». - GAMALEIA. - *Annales de l'Institut Pasteur*, pag. 436.

Mi attendevo di assistere alla coagulazione del latte in tutte le provette ed invece essa non avvenne neppure là dove era stato inoculato lo spirillo di Metschnikoff.

La reazione fu realmente trovata acida in modo spiccato già dopo 24 ore nelle culture degli spirilli di Koch, di Finkler e di Metschnikoff; in seconda giornata soltanto l'acidità comparve nel latte inoculato con lo spirillo di Deneke.

La vita nel latte così inacidito si spense dopo 6-7 giorni per i tre primi spirilli; fu atto ancora a svilupparsi in brodo di Löffler lo spirillo di Deneke trasportato da una cultura in latte zuccherato di 21 giorni.

Da tutto ciò risulta:

1° *Che le modificazioni del latte in cui furono coltivati gli spirilli di Finkler e di Metschnikoff non sono effetto dell'inacidimento, ma forse di un fermento analogo a quelli che molti batteri producono, come specialmente ha dimostrato Ducleaux nelle sue classiche esperienze sul latte (1).*

2° *Che gli acidi formati a spese del saccarosio, come sono capaci di sospendere prontamente sul brodo ogni attività dei batteri, così agiscono nello stesso modo nel latte ed impediscono la produzione del fermento coagulante da parte dello spirillo di Metschnikoff e di Finkler.*

*

Pongo fine alla esposizione dei fenomeni relativi alla vita dei quattro spirilli in presenza di idrati di carbonio, riportando alcune osservazioni circa allo sviluppo di essi sulle patate, alimento eminentemente idrocarbonato.

Si sa che non tutti i quattro batteri prosperano ugualmente bene sulle patate ordinarie. Non vi cresce quasi uno di essi, cioè lo spirillo di Deneke; si sviluppano gli spirilli di Koch e di Metschnikoff soltanto sulle patate tenute al termostato; meno esigente in fatto di temperatura è lo spirillo di Finkler, che si moltiplica bene sulle patate e nel termostato a 37° e fuori alla temperatura dell'ambiente.

(1) DUCLEAUX. *Etudes chimiques et microbiologiques*. Paris, 1887, pag. 115.

Supponendo che questo diverso comportamento degli spirilli sulle patate fosse dovuto alla acidità di queste, ho tentato la loro cultura su dischi di patate preparate secondo il metodo di Esmarch e tenute, prima della sterilizzazione all'autoclave, per 5' in una soluzione di Na^2CO^3 al 5 0/0.

Su questo materiale idrocarbonato, privato alla sua superficie della naturale acidità, ho trovato *che assai meglio si moltiplicano gli spirilli, riuscendo inoltre tutti a scilupparsi anche alla temperatura ordinaria. La cultura dello spirillo di Deneke assume poi un aspetto del tutto caratteristico, forma cioè una patina di un bel giallo vivace, assai più abbondante se il bacterio si sciluppò al calore dell'ambiente che non quando esso fu tenuto a 37°*

Roma, 3 settembre 1892.

