



MINISTERO DELL'INTERNO

Laboratori Scientifici della Direzione di Sanità

CONTRIBUTO ALLO STUDIO

DELLE

FERMENTAZIONI BACTERICHE

PER DOTTORI

B. GOSIO

A. SCLAVO

ASSISTENTI NEI LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

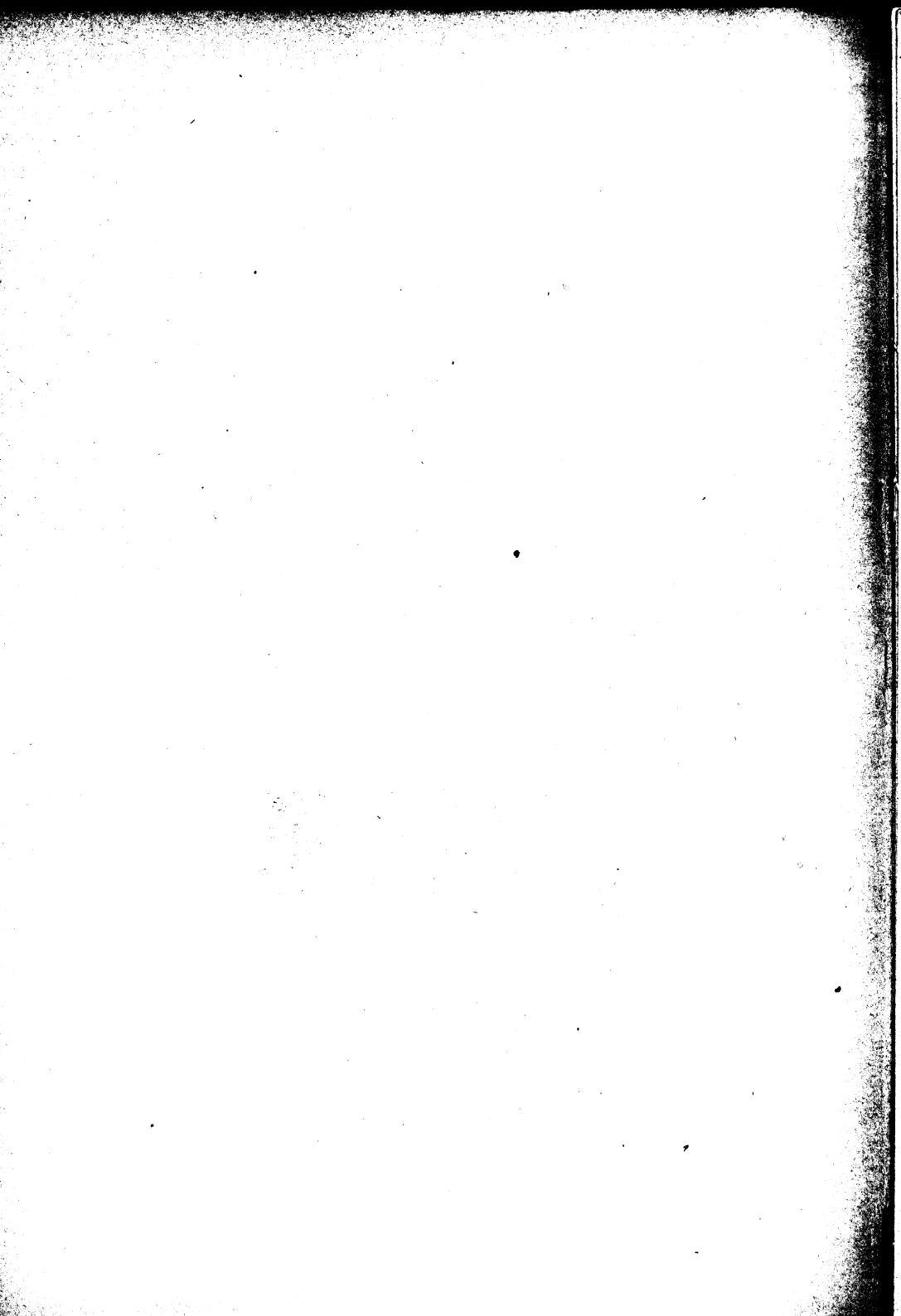


ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1890

Man. 9.50.19



MINISTERO DELL'INTERNO

Laboratori Scientifici della Direzione di Sanità

CONTRIBUTO ALLO STUDIO

DELLE

FERMENTAZIONI BACTERICHE

PER DOTTORI

B. GOSIO

A. SCLAVO

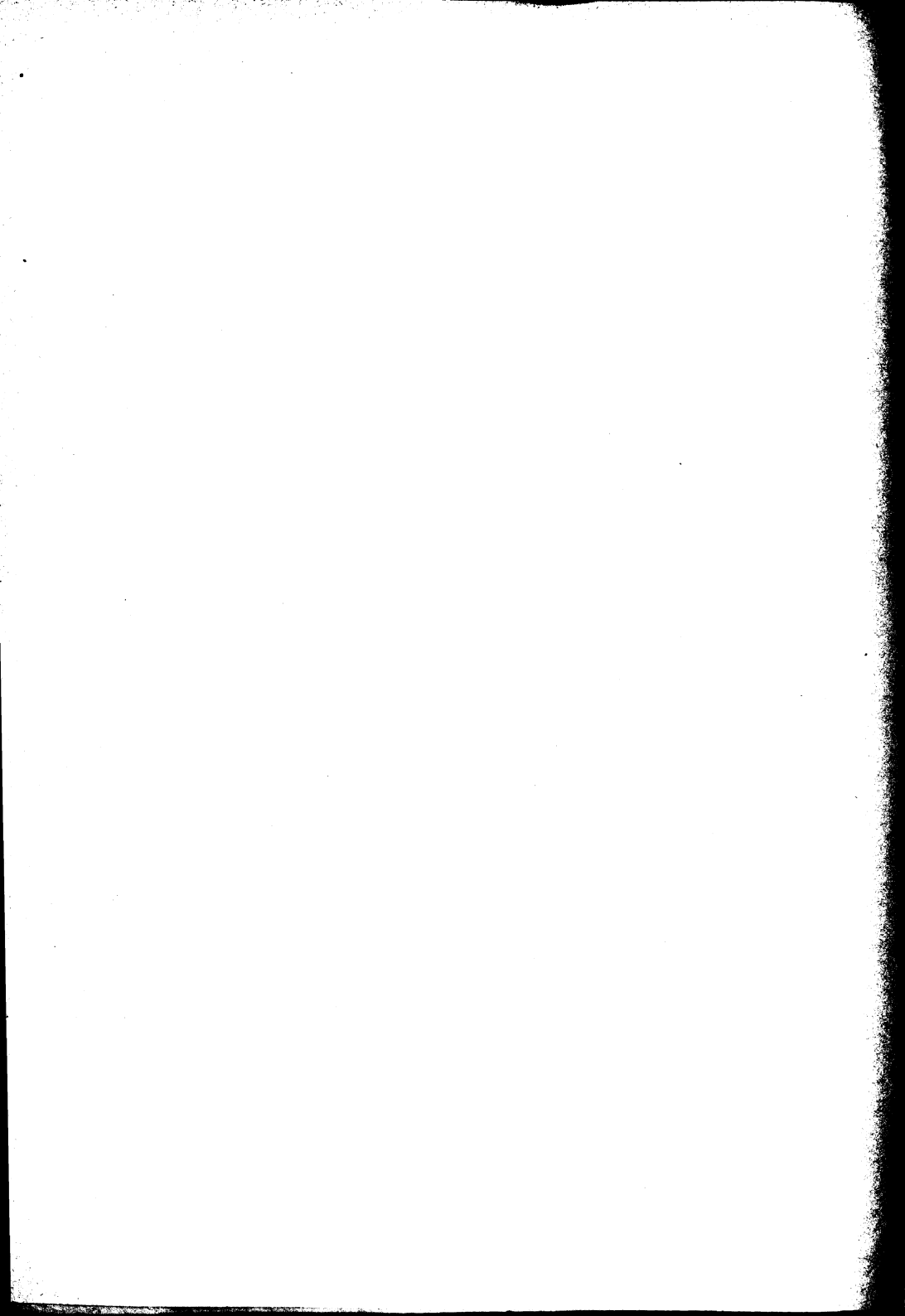
ASSISTENTI NEI LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1890



Numerosi sono i composti che la chimica ha potuto riconoscere come risultato della vita degli schizomiceti. Tuttavia molto resta ancora a ricercare sulle modificazioni che succedono nei diversi substrati nutritivi per opera delle singole specie. — Si sono studiati, è vero, con rigoroso metodo chimico i prodotti di parecchie fermentazioni batteriche; ma le analisi furono spesso istituite su culture, le quali è dubbio se fossero in istato di assoluta purezza.

È quindi giustificato ogni studio, che garantendo l'una e l'altra di queste condizioni, tenda ad illustrare la biologia di qualcuno fra questi potentissimi agenti di trasformazione della materia.

I fatti, su cui desideriamo richiamare l'attenzione, riguardano una speciale fermentazione dell'amido, il cui agente, un batterio, non corrisponde a nessuna delle specie fin ora conosciute, e trasforma in modo molto caratteristico i mezzi nutritivi dove prende sviluppo. Esso venne da noi isolato col mezzo delle culture a piatto da una salda d'amido abbandonata per molto tempo all'aria libera, e che mandava un forte odore di formaggio in via di decomposizione.

Nel renderci ragione di questo fatto, che d'altra parte era ovvio spiegare chimicamente, per la facilità con cui gli idrati di carbonio possono trasformarsi in acido valerianico, pensammo anzitutto a stabilire se ci trovavamo in presenza di un tipo regolare e ben definito di fermentazione. Fummo confermati nella nostra idea quando osservammo che tracce minime di quella cultura naturale aggiunte ad altre salde sterilizzate e no, valevano a ripetere la stessa fenomenologia. I primi saggi chimici fecero intanto notare una reazione acida spiccata in tutti i liquidi di prova; la presenza costante di una sostanza che riduceva prontamente l'ossido rameico in soluzione alcalina; e di più, nei prodotti distillati, le reazioni caratteristiche dell'alcool etilico.

Il processo però non era così semplice, come si poteva credere in principio. Sorvegliando attentamente di giorno in giorno l'andamento della fermentazione, potemmo constatare che le esalazioni gravi d'acido valerico erano precedute da un profumo gradito di frutta. — Ora il bacillo da noi isolato, fra tanti altri che non manifestavano caratteri degni di nota, mantenuto in cultura pura, riproduce costantemente (sovrattutto nelle salde d'amido) questo solo odore di frutta, senza alcun accenno alla formazione d'acido valerianico. Ad altri agenti era questo secondo compito riservato; e noi ne rimanderemo ad altro momento lo studio, occupandoci qui solo del primo periodo di questa singolare fermentazione trovata naturale nell'amido. I prodotti chi-

mici isolati da culture mantenute pure con rigoroso metodo batteriologico sono parecchi; ed in parte vennero già riscontrati fra quelli del ricambio materiale di altri germi: in complesso però, sia pel meccanismo in cui nel nostro caso vengono a formarsi, sia per la natura di taluni di essi, si può dire siano testimoni di un processo fermentativo affatto speciale non ancora studiato. Il fermento è rappresentato da un bacillo, cui appunto dal carattere più eminente che dispiega nei mezzi di cultura daremo il nome di *B. SUAVEOLENS*.



Il *b. suaveolens* è lungo da 2 a 4 micromillimetri e largo da 0.2 a 0.3; ha estremità arrotondate, non ha tendenza a riunirsi in lunghi filamenti ed è mobilissimo. Si colora bene colle ordinarie soluzioni acquose dei derivati d'anilina, e con il metodo di Gram. Cresce negli ordinari terreni di cultura anche a temperatura dell'ambiente (18°-20°), e in alcuni di essi, a parte la produzione della sostanza odorosa, assume caratteri degni di nota.

CULTURE A PIATTO — In gelatina le colonie viste a debole ingrandimento si presentano dopo 24 ore come piccoli corpi tondeggianti a contorno netto ed a superficie granulosa (fig. 1., tav. I). In seguito non tardano a comparire solchi più o meno marcati, più o meno numerosi (fig. 2, 3, 4, 5 e 6, tav. I), i quali farebbero pensare trattarsi di più colonie indipendenti riunite a gruppi, se l'osservazione a forti ingrandimenti non dimostrassero l'unità di origine di tutte queste formazioni (*).

(*) L'esame delle colonie con forti obbiettivi venne da noi fatto con un nostro metodo speciale che ne permette anche una lunga conservazione. In sostanza noi non facciamo altro che variare il metodo usato già da C. Günther (*Centralblatt für Bakteriologie* — VI Band N. 8/9) per le culture in agar rendendolo applicabile anche per quelle in gelatina, dove — a differenza dell'agar — realmente si può dire che lo sviluppo delle colonie avviene con caratteri speciali degni di nota per la diagnosi batteriologica.

Le lastre contenenti le colonie vengono disidratate in un bagno di glicerina purissima, mantenendo il bagno in un ambiente secco (ad es. in presenza di acido solforico concentrato). Dopo 5-6 giorni di questo trattamento, esse sono già ridotte in lamine sottilissime, asciutte senza essere raggrinzate e prive quasi d'ogni aderenza al vetro. Le colonie in questo processo di disidratazione si mantengono perfettamente normali. Esse si possono asportare tagliando tutt'intorno la gelatina con un bisturi e chiuderle in glicerina fra vetrini come un preparato istologico comune. — Le colonie del *b. suaveolens* così trattate da oltre un anno, si conservano oggi integre in tutte le minime particolarità.

Esperimentato su colonie di altri bacilli, questo processo ha dato vari risultati eccellenti: ad es. pel *b. radiforme*, nei primi stadi di sviluppo. Non si può applicare per le colonie rapidamente fluidificanti.

Altri metodi proposti per conservare le colonie dei bacilli fra vetrini sono quelli di Garré (1), Lipez (2), Jacobi (3), Plaut (4). Ma hanno l'inconveniente di essere molto più complicati.

(1) *Eine methode zur Conservirung der Culturen in den Koch'schen gelatineplatten* — Fortschritte der medicin Bd. IV N. 12 1886.

(2) *Lipez - Gefärbte Dauerpräparate von Desglasculturen* — Centralblatt f. B. I Jahrg 1887, I Band N. 13.

(3) *Jacobi - Härtung und Färbung von Plattenkulturen* — Centralblatt f. B. II Jahrg 1888, III Band N. 13.

(4) *Plaut - Zur conservirungstechnik* — Centralblatt f. B. V Band 1889 N. 9.

Col tempo le colonie crescono segmentandosi in generale sempre più, intanto che fittissimi ciuffi di filamenti emergono da ogni parte, facendo loro assumere le forme più bizzarre, sempre elegantissime (V. fig. delle tavole I II). — Come si vede, tale aspetto viene a ricordare molto quello delle colonie dei protei volgare e mirabile (1); ma se ne distingue senz'altro, perchè il bacillo *suaveolens* non fluidifica la gelatina.

Questa forma delle colonie è per altro ben lungi dall'essere costante: ma mentre è costante il tipo, in quanto che conserva per lo più una tendenza alla segmentazione ed allo sviluppo di appendici, l'aspetto definitivo è suscettibile di molte modificazioni; nè su di esse, ben note anche per le colonie di altri batteri, noi vogliamo insistere, perchè trovano un'esatta spiegazione nella varia concentrazione della gelatina e nella diversa temperatura a cui vengono mantenute le culture. Variando questi due fattori, ad es. abbassando la temperatura od aumentando la concentrazione del mezzo, si possono ottenere infinite gradazioni di forma, fino a mantenersi le colonie perfettamente rotonde e senza appendici. Questo ultimo aspetto poi è costante nelle - CULTURE IN AGAR - dove, salvo una maggiore estensione in superficie ed una leggiera sfrangiatura dei margini per le colonie che stanno alla superficie dell'agar o fra questo ed il vetro, tutte le altre, nello spessore, appaiono come tanti punticini che ricordano le colonie dello streptococco piogene.

CULTURA PER INFISIONE. — In *gelatina* il percorso dell'ago è segnato, dopo 15-24 ore, da una linea biancastra non molto appariscente e talora con brevi interruzioni. Per solito da questa parte assile partono ad angolo retto numerosi filamenti più o meno fini e lunghi, di solito claviformi (Vedi tavola I fig. 10). Anche qui la concentrazione del mezzo e la temperatura dell'ambiente sono modificatori potentissimi dello sviluppo. Così impiegando gelatina al 10 $\frac{9}{6}$, le infissioni che a 23-24 gradi per la molteplicità e delicatezza dei filamenti, ricordano quelle del bacillo del mal rosso dei suini o della setticemia dei topi, a più bassa temperatura (18-19) riproducono press'a poco quella dello streptococco piogene. Quest'ultimo aspetto si ripete poi costantemente e in modo più marcato nelle *infissioni in agar*. In ogni caso lo sviluppo non si estende mai in superficie.

CULTURA PER STRISCIAMENTO. — Non hanno alcunché di caratteristico. Sulla gelatina a becco di clarinetto, sull'agar e, meglio, sullo siero di sangue esse sono seguite dalla produzione di tanti punticini per solito isolati. Lo sviluppo non è mai tanto abbondante da costituire una vera pellicola.

CULTURA IN BRODO. — Il brodo alcalino, neutro od anche leggermente acido viene rapidamente (8-10 ore) intorbidato anche alla temperatura dell'ambiente (18°-25°). Se poi, avuto lo sviluppo, viene mantenuto fra 24 e 26 gradi, non tarda a comparire alla superficie una tenuissima pellicola, che si estende anche sulle pareti del tubo quasi a formare una specie di menisco concavo. — In seguito, lasciando in riposo assoluto la provetta, questa pellicola si riduce in sottili frantumi che man mano precipitano a fondo. Gli strati superiori del liquido allora si chiarificano per la deposizione degli elementi morfologici.

Tale deposizione dopo 10-15 giorni è d'ordinario così completa, che se dagli strati superficiali, evitando scosse al liquido, si fanno culture, esse rimangono sterili.

(1) HAUSER - *Über Faulnisbakterien*.

Il sedimento invece anche dopo 6-7 mesi è capace di dare luogo a rigoglioso sviluppo del bacillo.

Al microscopio questo deposito risulta costituito di forme bacillari e di spore ovalari molto rifrangenti: frequentemente poi occorre osservare questa seconda forma adattata alle estremità di un bacillo, in guisa da ricordare l'immagine di una spilla o di batocchio di campana.

Se i tubi di brodo vengono mantenuti in termostato a 37°, lo sviluppo è anche più rapido (5-6 ore): ma i preparati fatti con queste culture mostrano unicamente la presenza di forme bacillari.

CULTURA IN PATATE. — Le patate offrono al *b. suaveolens* un terreno molto favorevole. La cultura, soprattutto se è favorita da una temperatura alquanto elevata (28°-30°), è dopo 2-3 giorni rappresentata da una patina biancastra, che all'esame microscopico fa vedere le due forme di bacilli e di spore che abbiám sopra menzionato.

CULTURA IN INFUSI VEGETALI. — Oltre che in questi ordinari terreni, la cultura del *b. suaveolens* venne anche fatta in alcuni infusi vegetali. Il bacillo si sviluppa bene negli infusi di paglia, di fieno, di rape, carote e barbabietole quando però naturalmente non manifestino un'acidità eccessiva; se ciò si verifica è necessario neutralizzare con carbonato sodico, o con creta di Meudon.

×

La produzione della sostanza odorosa può dirsi un carattere normale che accompagna lo sviluppo del nostro bacillo in tutti i substrati nutritivi, specialmente liquidi; essa è sempre così abbondante, da potersi riconoscere molto bene anche odorando in prossimità del tappo onde sono chiuse le provette (soprattutto quando si abbia il riguardo di non bruciarlo). È però più che in tutti gli altri terreni, distinta nelle salde amidate, nel latte, nel brodo poco peptonizzato e nei diversi infusi vegetali. Viene singolarmente favorita dall'aggiunta di una terra alcalina (*Ca Co³*) e da una temperatura che oscilla fra 25 e 26 gradi. Soddisfatte queste esigenze, le colture, tanto più quelle in salde d'amido o nel latte, si mantengono profumate per un tempo anche considerevole. Noi conserviamo salde d'amido coltivate da oltre sei mesi e che sono sempre odorosissime. Si direbbe che, anziché scemare, col tempo questo carattere diventa in tale terreno anche più spiccato. Nel brodo invece il periodo di massima produzione del profumo si osserva nella prima settimana dello sviluppo del bacillo.

×

SPORIFICAZIONE — La riproduzione del bacillo, oltre che al solito processo di scissione generale per tutti gli schizomiceti è affidata anche alla formazione di spore, la quale avviene con particolarità degne di nota.

Parlando della coltivazione del bacillo nel brodo, accennammo come in date condizioni di temperatura (24°-26°) la superficie del liquido si ricopre di una sottile pellicola che man mano si raccoglie in uno scarso deposito bianchiccio al fondo dei tubi. Le forme ovalari ed a spillo, onde sono prevalentemente costituiti il deposito e la pellicola sono le spore (formate o in via di formazione) del *b. suaveolens*. Esse si

distinguono per i soliti caratteri di rifrangibilità; hanno uno spesso involucro colorabile; sono ovalari e con diametro trasverso superiore a quello dei bacilli da cui provengono. Le ordinarie soluzioni acquose dei colori basici d'anilina bastano anche a freddo a colorarle; e la colorazione, benché più debole si estende anche al centro. — Siamo qui in presenza di uno dei casi, in cui la spora non presenta la solita refrattarietà ad assumere le sostanze coloranti. Tale refrattarietà per altro, esagerata un tempo ed avanzata come carattere importante delle spore in genere, ha oggi trovato anche altre eccezioni (1).

Quanto alle modificazioni a cui va il protoplasma bacillare soggetto dal momento in cui si inizia la formazione della spora, fino a quando essa può dirsi costituita, noi vi tenemmo dietro facendo ripetuti e successivi preparati da culture in brodo mantenute in termostato fra 24 e 26 gradi di temperatura ed anche osservando con frequenza culture in goccia pendente messe pure nelle suaccennate condizioni di calore. Potemmo verificare che il protoplasma comincia in primo tempo ad addensarsi in singoli punti; questi poi vengono man mano a confluire in un centro unico che è costantemente rappresentato da un'estremità del bacillo. Via via allora l'ammasso che in tale modo si è costituito acquista il carattere di maggiore rifrangenza. In complesso il bacillo comincia a mostrare un'estremità lievemente ingrossata; l'ingrossamento cresce, intanto che si riassorbe il corpo bacillare; e, quando la spora è definitivamente compiuta, si presenta sotto forma di un ovicciuolo circondato da uno spesso involucro, i cui caratteri già vennero descritti.

La mobilità del bacillo scema col progredire di tutte queste modificazioni, fino a cessare del tutto, quando il cumolo di protoplasma destinato a diventare poi spora comincia a diventare rifrangente.

Il trovare alla superficie del brodo una pellicola ricca di spore, che poi sono destinate a cadere a fondo pel loro maggiore peso specifico, fa ritenere che la sporificazione debba prevalentemente effettuarsi sotto l'accesso dell'aria. Tuttavia non è questa la sola condizione che abbia importanza nella produzione del fenomeno: vi esercitano ancora notevole influenza:

1° *il mezzo di cultura*. Sull'agar ad esempio non si poté mai trovare alcuna spora, ma semplici forme bacillari, frammiste ad altre d'involuzione: e con tale mancanza concorda il fatto che una temperatura di 60° basta a rendere sterili in 20-25 minuti le culture fatte su questo mezzo: sulle patate invece la sporificazione si compie abbondantemente più che su ogni altro terreno;

2° *la reazione dell'ambiente*. Così sulle patate, per quanto siano terreno propizio, non si riesce in primo tempo ad ottenere spore, quando artificialmente sieno rese alcaline con carbonato di soda. Solo più tardi compaiono, quando per la speciale attività del bacillo, di cui in seguito parleremo, l'alcali viene neutralizzato;

3° *il grado di calore*. L'*optimum* di temperatura per la sporificazione nel brodo oscilla fra 24-23 gradi. A 27-28 ed a 22-23 sono già rarissime; sono del tutto assenti (esame microscopico — prove di resistenza al calore) a gradi rispettivamente superiori ed inferiori. Sulle patate i limiti sono alquanto più ampi: si possono ad ogni modo assegnare come limiti massimi ordinari i 22 ed i 29 gradi.

(1) C. FRAENKEL — *Grundriss der Bakterienkunde*.

Quando artificialmente tutte queste condizioni vengono soddisfatte, può vedersi compiere la sporificazione in brevissimo tempo: così coltivando il bacillo in brodo con aggiunta di carbonato di calce purissimo; lasciandolo a 37 gradi fino a sviluppo evidente e infine mantenendolo ad una temperatura oscillante fra 24-26 gradi, potemmo già dopo 5-6 ore verificare con preparati la presenza delle caratteristiche forme a spillo.

RESISTENZA. — Le spore su fili di seta preparati dalle patate secondo il metodo di Koch sopportano per 10 minuti la temperatura del calore umido a 100° e ne sono uccise in 20; sopportano il calore secco a 120° per 15 minuti; sono uccise in mezz'ora a 140°. — I fili essiccati e mantenuti all'asciutto sopra un piccolo bagno d'acido solforico concentrato, diedero ancora luogo allo sviluppo dopo 7 mesi.

Le forme vegetative del bacillo non sopportano, come accennammo, la temperatura di 55-60 gradi: ne vengono uccise in 20-25 minuti.

BISOGNO D'OSSIGENO. — Il bacillo *suaveolens* è aerobio facoltativo. — Fu coltivato in tubi di brodo (sistema di Grüber), dove si operò il vuoto mediante una pompa a mercurio. — In alcuni dei tubi poi l'aria fu sostituita con idrogeno; in altri con anidride carbonica, e in altri infine si lasciò semplicemente il vuoto. — Entro due giorni si verificò lo sviluppo in tutti i tubi eccetto che in quelli contenenti anidride carbonica. — Dopo una settimana poi si ruppe sotto cotone sterilizzato l'estremità tirata alla fiamma, agitando il tubo, allo scopo di sostituire più sollecitamente all'acido carbonico l'aria atmosferica; e in seguito a ciò si potè ancora constatare la moltiplicazione del germe.

L'acido carbonico agisce dunque su di lui come un paralizzante.

Se, per contro, si sostituisce l'aria con ossigeno, lo sviluppo viene sensibilmente favorito.

FACOLTÀ PATOGENA. — Il bacillo non dimostrò alcuna attività patogena nei conigli, le cavie e i piccioni. Questi animali si mostrarono indifferenti anche a grandi quantità di cultura inoculata sotto la pelle e nel peritoneo.

DIFFUSIONE DEL BACILLO. — Sulla diffusione in natura del *b. suaveolens* non siamo per ora in grado di dare notizie molto estese. Ne potemmo per altro dimostrare la presenza costante nell'aria dell'armadio, dove era stata abbandonata la prima salda d'amido onde venne isolato; e l'ottenemmo ancora come colonia d'inquinazione sopra lastre di gelatina lasciate in laboratorio mal riparate dai germi atmosferici.

L'ipotesi che esso si trovi in qualche specie di formaggio (essendo le commessure di quell'armadio saldate d'un impasto di cacio sgrassato e calce spenta) non ebbe ancora alcuna conferma nelle numerose culture fatte con formaggi di natura diversa. — Nè l'Adametz, nel suo esteso lavoro sul processo di maturazione dei formaggi in rapporto coi batteri (1), accenna a specie alcuna che, per caratteri descritti, corrispondano a quella da noi studiata.

PRODUZIONE DI ACIDI. — Una nota importante sulla biologia del bacillo di cui ci occupiamo è la facoltà che esso possiede in grado notevole di acidificare tutti i mezzi dove prende sviluppo. — Questa acidità interviene in tempo brevissimo; e, salvo la presenza di neutralizzanti, raggiunge presto un limite, che più non oltrepassa. —

Un tale grado di acidità, la quale giustamente può essere detta *nociva*, fu determinata nelle salde d'amido all'1 % fatte in brodo alcalino non peptonizzato.

Si distribui la salda in palloncini di Pasteur in ragione di 50 cm. c. per palloncino; alcuni di essi furono inoculati con cultura pura del bacillo, ed altri conservati come testimoni. — Per le determinazioni quantitative s'impiegarono soluzioni centinormali di potassa caustica e di acido ossalico. Come sostanze indici adoperammo l'acido rosolico, l'alizarina e il lacmus. Si mostrò affatto inadatta la fenolfaleina, che nella determinazione dell'alcalinità nei liquidi albuminosi (latte-brodo) può dar luogo ad equivoci grossolani. — Nel nostro caso ad esempio, si otteneva per mezzo della fenolfaleina un'acidità circa doppia di quella che risultava concordemente mediante l'impiego degli altri indici.

Nel liquido testimonio si riscontrò un'alcalinità di gr 0,0302 % calcolata in potassa; nei palloncini inoculati si trovò un'acidità corrispondente a gr. 0,0676 di KOH. Questi due valori addizionati danno un'alcalinità in potassa di gr. 0,0978 capace di saturare tutti gli acidi prodotti dal batterio. Tale grado di acidità fu raggiunto nelle culture in tre giorni; nè al di là di questo tempo si ebbero aumenti apprezzabili. Quando invece gli acidi vengano neutralizzati man mano da una terra alcalina (Ca CO_3), la loro produzione può raggiungere un grado elevatissimo, con separazione dal liquido di abbondante quantità di sale terroso.



Piccola esigenza ha il *b. suaveolens* verso il materiale azotato. — Gli è più che sufficiente quello contenuto come impurità nell'amido commerciale. Ad ogni modo, per lo meno in tracce, gli è necessario: di fatti, l'amido da noi sottoposto a prolungati lavaggi in acqua distillata, diventò terreno sterile alla cultura del germe. — Basta per altro ad ottenere lo sviluppo anche solo l'aggiunta in piccola quantità di nitrati o di nitrati: Il bacillo mostra così di poter utilizzare l'azoto, anche quando gli venga offerto sotto forma inorganica.

Ricerche chimiche sui prodotti della fermentazione.

Avuto riguardo al terreno di coltura, che si offerse spontaneo al *b. suaveolens*, credemmo opportuno mantenerci in condizioni analoghe, venuto il momento di indagare i prodotti della sua biologia. Fu scelto adunque come mezzo di coltura l'amido (di riso). Con esso si preparò una salda all'1 $\frac{1}{2}$ per %; fu distribuita in molti palloni con aggiunta di creta di Meudon; fu sterilizzata nella pentola di Koch; e, per mezzo della pipetta di Chamberland, seminata con cultura in brodo del bacillo, lasciandone alcuni campioni intatti quali testimoni. — Su questo materiale d'analisi vennero successivamente instituite le ricerche, di cui rendiamo per ora conto in ordine ai fenomeni più caratteristici che si rivelano.

Destrina. In un primo momento della fermentazione l'amido viene trasformato in destrina; e nel nostro caso, in cui il carbonato di calce manteneva neutro il mezzo, man mano che acidi si producevano, questa trasformazione fu completa tanto, che dopo cinque mesi non si riuscì più ad ottenere la sensibile reazione dell'amido per mezzo della tintura di iodio. Intanto l'esame microscopico delle culture fa riconoscere avanzi di cellule amilacee disfatte, spore del bacillo, e cristallini minutissimi non tutti di carbonato calcareo. Come mutamenti macroscopici nel processo fermentativo devonsi ricordare una rapida limpidificazione delle salde d'amido, le quali assumono man mano una tinta giallo-verdognola; il raccogliersi d'un deposito bianchiccio in fondo del recipiente; e, in seguito, bollicine di gas che vengono con frequenza a rendersi libere alla superficie del liquido. Il liquido esaminato al polaristobometro di Wil, fa deviare fortemente a destra il piano della luce polarizzata.

Glucosio. Oltre alla destrina, si forma un idrato di carbonio che ha lo stesso comportamento del glucosio, come dimostra la riduzione del liquido di Fehling e del sotto-nitrato di bismuto in presenza di potassa. Questa sostanza, che si trova sempre in piccola quantità, soprattutto negli ultimi periodi della fermentazione, rappresenta probabilmente la forma solubile di idrato di carbonio originatosi per azione successiva sulla destrina, e che immediatamente è dal bacillo utilizzata per la formazione di prodotti più complessi. Si può qui con ragione ritenere che tale proprietà saccarificante stia in rapporto coll'intervento di una diastasi secreta dal bacillo; essa non può riferirsi d'altronde all'azione dell'acido, in quanto che è più spiccata quando il mezzo è mantenuto neutro dal carbonato di calce. — Noi tentammo di dimostrare la diastasi eliminando dalle culture i bacilli, sia coll'ucciderli mantenendoli per più giorni alla temperatura di 55-60 gradi (le diastasi a questa temperatura non diventano inattive) sia coll'arrestarle nel filtro di Chamberland, e provando se col liquido si poteva saccarificare l'amido così come avviene per la saliva. — Non si ebbero risultati positivi.

Contemporaneamente a questi semplici fenomeni di idratazione comuni a molte specie di micro-organismi (1) e facili a rilevarsi con saggi chimici, spicca un altro fatto di maggior interesse: la produzione di discreta quantità di eteri, che rappresentano appunto la sostanza odorosa elaborata dal bacillo.

Eteri. Fra essi, dato il delizioso profumo di frutta, che talora ricorda il vero ananas, e data la constatazione, come in seguito dimostreremo, dell'alcool e dell'acido butirrico, siamo indotti ad ammettere il butirrato di etile. Ad ogni modo, siccome per la scarsità del materiale d'esame, non fu ottenuto come etere puro, così né siamo autorizzati a ritenerlo in modo assoluto per dimostrato, né tanto meno ad escludere la concomitanza di altri eteri.

Ecco frattanto, tralasciando i superflui dettagli della tecnica, il processo seguito nella ricerca qualitativa dei composti chimici ed i risultati ottenuti:

Acidi volatili. Il liquido di alcuni palloni, fu, dopo cinque mesi di fermentazione, distillato in presenza di acido solforico diluito, agevolando lo sviluppo con una forte corrente di vapore acqueo. — Il distillato reso esattamente neutro con acqua di barite, venne mandato a dolce evaporazione prima su bagno maria, ed in ultimo nel vuoto.

(1) A. PICK — *Ueber die sacccharificirende Thätigkeit einiger Mikroorganismen.* (Wiener klinische Wochenschrift 1889 - N. 5, 6 e 7).

Quando il liquido giunse a consistenza sciropposa si ebbe a notare un abbondante precipitazione di cristalli aghiiformi e fogliacei, ed a riconoscerli con saggi chimici la presenza dell'acido acetico, del butirrico e del formico.

Difatti l'aggiunta di acido solforico ad una porzione di sostanza sciolta in piccola quantità d'acqua, diede luogo alla separazione di goccioline oleose di acido butirrico normale riconosciuto all'odore suo e del suo etere etilico. — Separate queste goccioline, si poterono avere nel resto del liquido filtrato le reazioni comuni dell'acido acetico: colorazione rossa col percloruro di ferro, previa neutralizzazione con ammoniaca; formazione dell'etere etil-acetico in presenza di alcool ed acido solforico; sviluppo di vapori di ossido di cacodilo dati riscaldando il sale ben secco in presenza di anidride arseniosa.

Acido
butirrico.

Acido
acetico.

Tutta la rimanente sostanza fu esaurita con alcool a 85° G L.

Acido
formico.

Nella parte insolubile, costituita prevalentemente di acetato di bario, si riconobbero anche tracce di formiato (notevolissima riduzione dei sali d'argento — riduzione del bicloruro mercurico in calomelano).

I liquidi alcoolici di esaurimento evaporati a secchezza diedero un residuo, che ripreso con poca acqua servi alla preparazione dei sali d'argento. — Per il butirrato d'argento, ottenuto in quantità bastevole, si determinò anche il quantitativo in metallo, precipitando l'argento coll'acido cloridrico, e pesandolo allo stato di cloruro. Esso riuscì però leggermente elevato, in causa delle impurità dovute certamente a tracce di acetato. La scarsità del materiale non permetteva d'altra parte una assoluta purificazione:

Sostanza	gr. 0,33005
Ag. calcolato	> 0,18280
Ag. trovato	> 0,18390

In una corrente di vapore acqueo si distillarono circa quattro litri di coltura. Il prodotto neutro redistillato in presenza di ossido di magnesio fornì un liquido, che, purificato per successive destillazioni frazionate a gradi di temperatura sempre più bassi, cominciava a bollire verso 30-40 gradi: aveva odore fortemente alcoolico, bruciava con fiamma azzurrugnola e forniva manifeste queste reazioni:

Alcool
etilico.

1. Separazione di cristalli esagonali di iodoformio in presenza di soluzione di Lugol in liscivia potassica (*prova di Lieben*);

2. Riduzione, in presenza di acido solforico, del bicromato di potassio in solfato di cromo (colorazione verde del liquido);

3. Nessun precipitato coll'aggiunta di ammoniaca e di tintura di iodio (*reazione di Gunning*);

4. Colorazione rosso-rubina per adizione di nitroprussiato sodico in liscivia alcalina: ingiallisce all'aggiunta di acido acetico (*reazione di Lega*);

5. Evidentissima la reazione di Vitali per l'alcool: formazione dell'etildisolfocarbonato di molibdeno in presenza di molibdato d'ammonio, acido solforico, potassa e solfuro di carbonio (colorazione rosso-vinosa che passa al solfuro di carbonio).

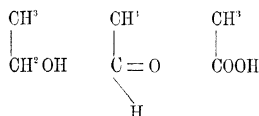
6. Formazione dello specchio metallico per riduzione del nitrato d'argento ammoniacale in presenza di liscivia di sodi (*reazione di Tollens* per l'aldeide).

Aldeide
etilica.

Questi saggi ci autorizzano senz'altro ad ammettere la presenza dell'alcool e dell'aldeide, e ad escludere l'acetone.

×

Se si prendono a considerare i prodotti da noi per ora riconosciuti, e si mettono fra loro in rapporto con riguardo alla natura del mezzo da cui provengono (amido) è facile distinguere nelle manifestazioni biologiche del *b. suaveolens* due periodi; nel primo dei quali con fenomeni di idratazione, vien reso solubile e si saccarifica il materiale a lui offerto (amido-destrina-glucosio); in un secondo si originano prodotti (alcool-aldeide-acidoacetico) che rappresentano stadi diversi di un'ossidazione progressiva:



Frattanto deve avvenire per opera del radicale etile una saturazione di parte degli acidi e conseguente formazione di eteri fra cui l'etil-butirrico è quello che meglio spiega il genere di profumo che si svolge dalle culture.

In questi ultimi composti consiste appunto la specificità d'azione del nostro bacillo, in quantochè gli acidi formico, butirrico ed acetico sono per sé soli prodotti abbastanza comuni nel ricambio materiale dei batteri in genere. Tra le sostanze formatesi per l'attività dei batteri nei terreni a base di idrato di carbonio, l'alcool stesso fu trovato da Fitz e da Brieger: il bacillo del tifo pure forma dell'alcool etilico e dell'acido acetico, come pure dell'acido lattico a spese del glucosio e dell'amido (1).

Più interessante è il riconoscimento dell'aldeide. Ultimamente però (benchè non per la classe dei bacilli) G. Linossier e G. Boux (2) trovarono questa sostanza fra i prodotti che si originano nella fermentazione degli idrati di carbonio determinata dal fungo del mughetto.

Riguardo poi alla produzione di sostanze odorose, bisogna notare che, volendo prendere queste parole in un ampio significato, quasi tutti i batteri sono capaci di determinare nei substrati nutritivi tali cambiamenti, da essere apprezzabili anche all'olfatto. Sono noti fra gli altri l'odore di trimetilamina che mandano le culture del *b. prodigioso*, quello urinoso del fluorescente putido, quello di colla prodotto dagli stafilococchi in genere ecc. Ad ogni modo trattasi qui in massima parte di odori spiacevoli, sintomo di processi putrefattivi in genere. — Fra i rari casi di esalazioni grate è a ricordarsi quello del *fusisporium moscatum* studiato da Kitasato (3) e da Heller (4) come produttore di una sostanza che ricorda il muschio e l'altro di Gal-

(1) FLÜGGE — *Les microorganismes*, Pag. 451 edizione francese.

(2) *Journal de pharmacie*, 45 giugno 1890.

(3) KITASATO — *Ueber Moschuspilz* — (*Centralblatt für Bakteriologie* ecc. — V Band — N. 1)

(4) HELLER — *Contribution à la connaissance du champignon musqué* — *Annales de micrographie* — N. 11 e 89.

tier (1) che isolò dal sistema ganglionare del porco un microbo patogeno caratteristico per la facoltà cromogena e per un odore aromatico gradevole che impartisce al brodo. In nessuno dei due casi però fu la sostanza odorosa chimicamente riconosciuta:

Se ora cerchiamo di esprimere in breve quale genere d'azione spieghi il nostro bacillo in tutto il lavoro descritto, dobbiamo dire che in gran parte si tratta di un'azione ossidante. Lo provano le culture fatte in latte colorito con carmino d'indaco. — Il *b. suaveolens* riduce nei primi momenti della sua vita rigogliosa, e rapidamente, il carmino d'indaco, trasformandolo in indaco bianco; in seguito, ma lentamente, lo riossida fino a ridargli in pochi giorni il perfetto colore primitivo; questa stessa esperienza fatta contemporaneamente con bacilli aerobi obbligati (*b. del carbonchio* — *b. sottile*....) ha dato bensì luogo al primo fenomeno di riduzione dell'indaco; ma in seguito esso rimase scolorato. Non è assolutamente da attribuirsi nel primo caso la riossidazione all'ossigeno atmosferico, essendo il latte nelle provette ricoperto da alto strato di crema.

Una più ampia conferma di tali fatti potremmo averla facendo colture in presenza di composti non completamente ossidati. Preferimmo i sali dell'acido nitroso, perchè mentre da una parte sono composti sufficientemente stabili da potersi cimentare su di essi il potere ossidante del bacillo, non sono dall'altra a questo menomamente dannosi; anzi ne favoriscono lo sviluppo come vedemmo, fornendogli materiale azotato.

Con amido puro di riso si preparò una salda al $\frac{1}{2}$ per 100 in acqua distillata; e vi si aggiunse tanto di nitrato potassico, fino ad avere dai saggi con ioduro di zinco amidato ed acido solforico una pronta reazione. — Distribuita in provette e sterilizzata frazionatamente alla pentola di Koch, servì come materiale di coltura. — Dopo una settimana si praticarono i saggi. — *La reazione dei nitrati, mentre era evidentissima e pronta in tutti i tubi lasciati come testimoni, non si otteneva più in quelli inoculati: viceversa era in essi evidentissima la reazione alla difenilammina, la quale, esclusi i nitrati, diventa dimostrativa per i nitrati.*

Si potrebbe da questo fatto dedurre che il bacillo abbia attitudine a nitrificare: essa però non fu sperimentata sopra composti dell'azoto semplicemente idrogenati, nella cui ossidazione fino a formazione di nitrati consiste appunto il vero processo della nitrificazione.

Conchiudendo, nel presente studio abbiamo, come si vede, soprattutto indirizzato le nostre ricerche sui prodotti volatili che si trovano in questo genere di fermentazione dell'amido: le sostanze riconosciutevi rendono sufficiente ragione della sostanza odorosa che è il carattere principale manifestato del *b. suaveolens* nelle culture. Ma la forte acidificazione del mezzo, la completa trasformazione dei materiali idrocarbonati e la notevole quantità di sale di calce che si forma per lo sdoppiamento del carbonato,

(1) GALTIER — Sur un microbe pathogène chronique aromatique. (Journal de médecine vétérinaire et de Zootechnie — t. XXXIX juin 1888).

portano giustamente a ritenere che anche altri acidi oltre al formico, all'acetico ed al butirrico sieno presenti. Potrebbe semplicemente trattarsi dei primi stadi di ossidazione del glucosio per un meccanismo analogo a quello dei micrococchi di Botroux (1) che trasformano il glucosio in acido gluconico ed ossigluconio, o potrebbero anche essere presenti altri acidi fissi.

Queste interessanti particolarità formeranno ad ogni modo oggetto di altro prossimo lavoro.

(1) L. BOTROUX — *Sur l'oxydation du glucose pour les microbes*, Annales de l'Institut Pasteur — 1888 — N. 6.



SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

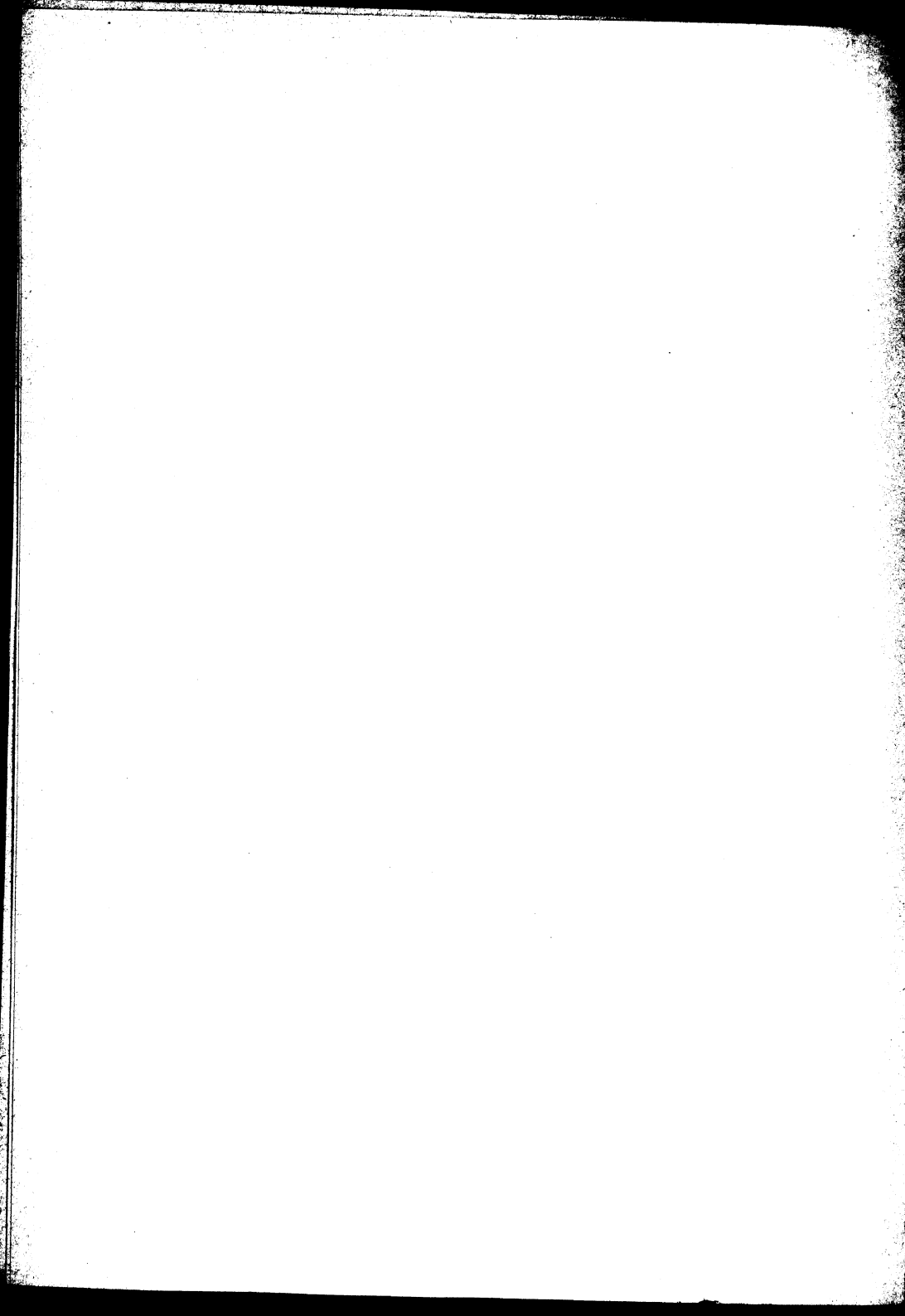
TAVOLA I. — *Fig.* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 — Successive modificazioni a cui vanno soggette le colonie del *bac. suaveolens* nel loro sviluppo.

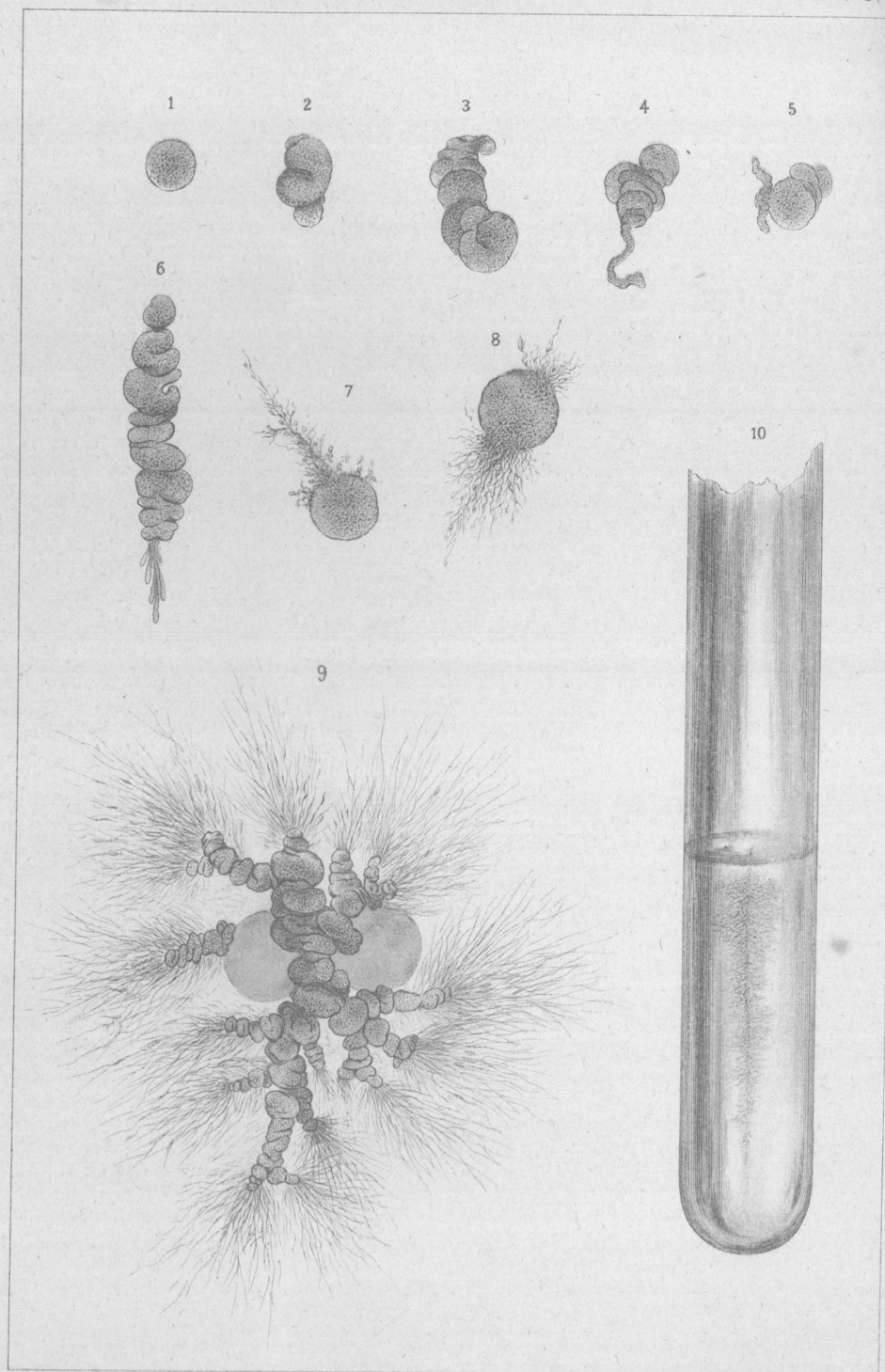
Le *fig.* 7-8 riproducono un altro tipo di colonie in cui alla segmentazione prevale lo sviluppo di filamenti. — Ingrandim. 120 diam.

Fig. 10 — Coltura per infissione — temperat. 20°-22°).

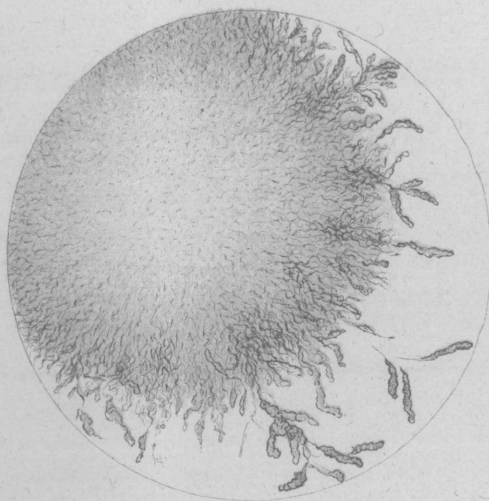
TAVOLA II. — *Fig.* 1, 2 — Colonie dello stesso bacillo. Lo sviluppo del maggior numero delle appendici è in rapporto alla temperatura più elevata a cui vennero mantenute le culture (22°-24°) — Ingrandim. 120 diam. Tutte queste colture vennero fatte in gelatina al 10 %.

TAVOLA III. — *Fig.* 1. — Preparato di una cultura in brodo di *bac. suaveolens*. — Forme bacillari: qualche individuo presenta un'estremità ingrossata per la sporificazione. *Fig.* 2. Spore formate o in via di formazione del *bac. suaveolens*. (Da cultura in brodo di 3 giorni — Ingrand. 800 diam.)

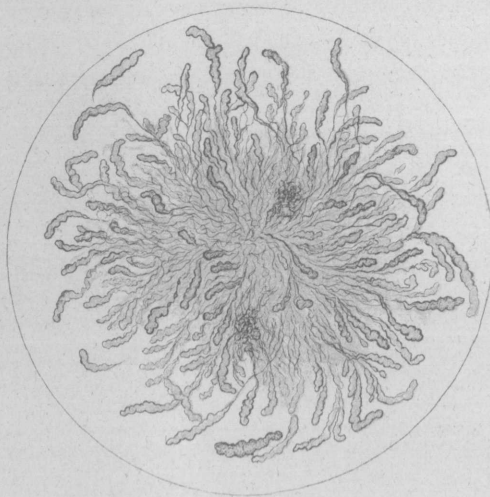




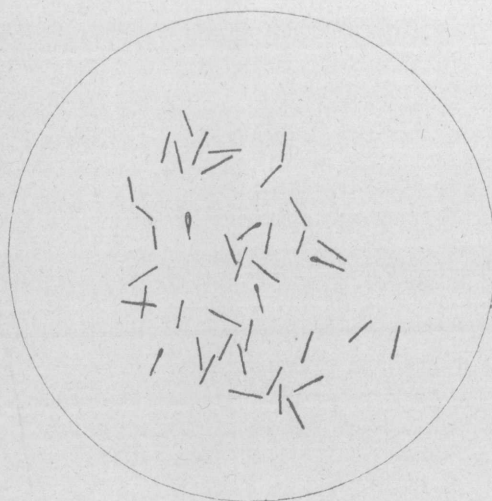
1



2



1



2





