



REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

(ANNO CCLXXXV 1888)

NUOVE RICERCHE

INTORNO ALL'AZIONE DI ALCUNE CONDIZIONI FISICHE

SULLA VITA DEI MICROORGANISMI

MEMORIA

DEI DOTTORI

E. BONARDI E G. G. GEROSA



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1888

Mr. A. 50. 27

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

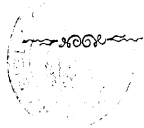
(ANNO CCLXXXV 1888)

NUOVE RICERCHE
INTORNO ALL'AZIONE DI ALCUNE CONDIZIONI FISICHE
SULLA VITA DEI MICROORGANISMI

MEMORIA

DEI DOTTORI

E. BONARDI E G. G. GEROSA



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1888

SERIE 4^a — *Memorie della Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali*
Vol. V. — *Seduta del 3 giugno 1888.*

RELAZIONE

letta dal Socio C. TOMMASI-CRUDELI, relatore, a nome anche del Socio S. TRINCHESE nella seduta del 3 giugno 1888 sulla Memoria dei dott. E. BONARDI e G. G. GEROSA, intitolata: *Nuove ricerche intorno all'azione di alcune condizioni fisiche sulla vita dei microorganismi.*

« I due autori han fatto precedere la esposizione delle loro ricerche sperimentali da uno studio storico-critico molto accurato di tutti i lavori che hanno avuto per iscopo di determinare l'influenza esercitata sullo sviluppo dei microorganismi dalla temperatura, dalla elettricità, dalla luce, da' diversi ambienti gassosi e dalla pressione. Essi rilevano comesi sia data sin qui troppo poca importanza alla influenza della densità delle soluzioni nelle quali lo sviluppo di questi esseri avviene, e nelle loro ricerche hanno avuto principalmente in mira lo studio di questa influenza, della quale hanno saputo dimostrare l'efficacia nelle varie modalità di sviluppo dei microorganismi. I loro sperimenti sono stati condotti con molto rigore di metodo, ed applicati che siano allo studio biologico dei singoli microorganismi essi promettono dei risultati importanti. La Commissione quindi propone la stampa di questo scritto negli Atti dell'Accademia ».

I.

1. Ormai tutti i naturalisti coscienziosi e spregiudicati ammettono come una cosa razionalmente necessaria che la vita sia il fenomeno ultimo e più complesso dell'evoluzione del nostro sistema solare, e che i fatti biologici si possano in ultima analisi ridurre a semplici fenomeni meccanici.

E poichè la forma, come disse Gegenbaur, è una funzione della materia eternamente mobile, si comprende quanto lo studio delle condizioni, in cui si trova un organismo, sia importante per spiegare la sua architettura e la sua biologia, nonchè la mutazione che nell'una e nell'altra si manifestano col cambiare delle condizioni stesse. Perciò abbiamo creduto non del tutto privo di interesse il riferire i risultati conseguiti nella presente ricerca, tanto più oggi, che i microorganismi e specialmente gli schizomiceti, hanno assunto un grande significato patogenetico, e che le ricerche numerose intorno alle loro condizioni biologiche sembrano non di rado rigorose per quanto riguarda la pompa degli apparecchi, ma difettose nel metodo e nel concetto scientifico.

2. Alla densità delle soluzioni, entro le quali debbono svilupparsi i microorganismi, si è dato finora troppo poca importanza, se si fa astrazione dei lavori dei prof. Cantoni e Maggi dell'Università di Pavia. Noi abbiamo eseguito le esperienze appunto su soluzioni organiche di densità differenti, assoggettandole isolatamente e simultaneamente all'azione di diverse temperature, di correnti elettriche continue ed indotte, del magnetismo, di vari gas e di varie luci.

Durarono le nostre esperienze parte dello scorso anno ed il corrente fino all'aprile incluso. L'indole loro dice già che furono eseguite per la maggior parte in un laboratorio di fisica (quello dell'Università di Pavia). È quasi superfluo il dire che abbiamo usato rigorosamente le cautele necessarie per un ordine di ricerche tanto delicate, cautele riguardanti non solo le preparazioni delle soluzioni, la perfetta pulizia loro e degli oggetti, ma anche la misura e la durata delle influenze fisiche messe in azione.

Abbiamo osservati i fatti e dedotte spassionatamente le conclusioni, senza preoccupazioni eterogenistiche o panspermistiche.

II.

Cenni storico-critici.

A. Influenza della temperatura superiore allo zero termometrico.

1. Intorno all'influenza della temperatura sui germi e sui microorganismi sono celebri le esperienze dello Spallanzani. Egli poneva la soluzione organica in bottigliette di vetro a collo lungo ed affilato, che poi chiudeva ermeticamente, adoperando qualche volta anche la fusione del vetro (esperienze sulle mufte). Afferma che in diciannove bottiglie, così preparate e tenute per un'ora nell'acqua bollente, non ottenne poi alcun infusorio (¹). Dimostrò che i semi dei legumi non si svolgono dopo l'ebollizione e che i germi degli infusori, malgrado la loro piccolezza, non possono sottrarsi all'azione del fuoco (²). Dimostrò inoltre che le spore bollite delle mufte possono germinare ancora (³).

2. Dutrochet (⁴) sostenne sperimentalmente che le *Characee* poste nell'acqua conservano la vita ed il moto rotatorio fino ad una temperatura di 45° C.

3. Descloiseaux (⁵) ha presentato all'Accademia di Parigi delle *Conferve*, raccolte in Islanda nella terma di Gröf, ad una temperatura di 98° C.

4. Milne Edwards (⁶) ripeté l'esperienza di Spallanzani tenendo l'infusione, chiusa a fuoco in un palloncino di vetro, entro un bagno bollente di acqua per alcuni minuti. Non ottenne sviluppo di microorganismi.

5. Ehrenberg (⁷) trovò nelle sorgenti termali di Ischia ad una temperatura di 80°-85° C., oscillarie ed eunotie viventi e mobili; nell'acqua di Sinigaglia, ad una temperatura di 81° C. osservò quattro specie di rotiferi celeremente moventisi e parecchi infusori dei generi *Nassula*, *Enchelys* ed *Amphyleptus*, nonchè la *Eunotia Sancti Antonii* delle isole del Capo Verde.

6. Max Schultze (⁸) mantenne vivo l'*Actinophrys Eichornii* per 12-14 ore nell'acqua alla temperatura di 42° C. A questa temperatura non vivono invece la *Diflugie* e le *Amebe*; le *Vorticelle* morrebbero a 41°; le *Anguillule*, le *Turbellarie*, le *Naidi*, gli *Ostracodi* resisterebbero ad una temperatura di 43°-45° C. Il movimento protoplasmatico e la vita dei peli della *Tradescantia virginica*, della *Vallisneria spiralis*, della *Urtica urens* cesserebbero ad una temperatura di 47°-48° C.

7. Nella sua celebre Memoria *Sui corpuscoli organizzati, che esistono nell'atmosfera* (⁹) Pasteur dimostra che, mentre nelle infusioni acide lo sviluppo dei

(1) Opere di Lazzaro Spallanzani. Milano, 1826, tom. V, p. 351 e seguenti.

(2) Lazzaro Spallanzani, loc. cit.; tom. V, p. 340.

(3) Lazzaro Spallanzani, *Opuscoli di fisica animale e vegetale*. Modena, 1776, tom. II, p. 257.

(4) Comp. Rend. 1837, tom. V, p. 777.

(5) Comp. Rend. 1846, tom. XXIII, p. 931.

(6) Ann. des sciences naturelles. 5, 4^a, tom. IX, p. 350, 1858.

(7) Monatsbericht der königl. Akademie der Wissenschaften ecc. Berlin, 21 ottobre 1858.

(8) Max Schultze, *Das Protoplasma der Rhizopoden und der Pflanzenzellen*, 1860.

(9) Annales de chimie, vol. 64^e, 1862.

germi è impedito da una temperatura di 100°, nelle infusioni alcaline invece per produrre il medesimo effetto è necessaria una temperatura più elevata.

8. Cohn (1863) ⁽¹⁾ afferma che oltre i 53° C. le *alghe* non possono più vivere.

9. Pouchet ⁽²⁾ assegna agli infusori un limite massimo di temperatura di 55° C.

10. Cavalleri ⁽³⁾ sperimentando sulle soluzioni organiche ermeticamente chiuse in tubetti di vetro e scaldate per 15 minuti a 100° C. od anche solamente a 80°-90° C. non poté constatare lo sviluppo di vibrioni.

11. Mantegazza e Cantoni ⁽⁴⁾ eseguirono parecchie esperienze, introducendo varie infusioni organiche in palloncini a collo lungo ed affilato, facendole lungamente bollire e poi chiudendo il collo del recipiente coll'olipila, quando il vapor d'acqua aveva scacciato tutta l'aria. Aprivano poi i palloncini sotto una campana, dapprima riempita con acqua bollente e nella quale introducevano successivamente aria arroventata. Durante le esperienze i recipienti si trovarono in un ambiente la cui temperatura oscillò fra 24° e 27° C., e tutti diedero, in uno spazio di tempo variabile da 10 a 17 giorni, numerosi microorganismi (bacilli, bacteri, vibrioni).

12. Di considerevole importanza sono le esperienze di Cantoni ed Oehl ⁽⁵⁾ sullo sviluppo degli infusori.

Un infuso di farina di fave filtrato veniva chiuso, con un volume d'aria triplo o quadruplo entro palloncini di vetro, col fonderne il collo affilato. Codesti palloncini venivano gradatamente riscaldati entro una pentola fino a 100° C. e mantenuti poi a questa temperatura per circa 10 minuti. In parecchi casi ottennero vibrioni, in altri no; ed il risultato fu sempre negativo quando i palloncini venivano scaldati a 115-130° C. entro la pentola di Papin.

Questa prima serie di esperienze venne eseguita nell'autunno 1865, in una stagione quindi poco adatta. Nell'estate del 1866 gli illustri sperimentatori ricominciarono le ricerche, adoperando brodo preparato con buon muscolo di bue. Ebbero cura di adoperare palloncini più capaci dei precedenti e di introdurre meno liquido; cosicchè ciascuno di essi conteneva circa 4 cc. di brodo a contatto con altri 90 cc. di aria. Chiusi a fusione di vetro furono mantenuti a 100°, alcuni per 10, altri per 30 ed altri per 60 minuti. Lasciati poi in un ambiente di temperatura non inferiore a 26° C. tutti diedero in un giorno o poco più una grande quantità di vibrioni. Diluendo il brodo osservarono che lo sviluppo dei microorganismi diminuiva rapidamente fino a ridursi minimo quando la diluizione raggiungeva un dato limite. Perciò il Cantoni ⁽⁶⁾ in una sua nota speciale deduce che la scarsità delle sostanze organiche, nei liquidi

⁽¹⁾ Cohn, *Ueber die Algen des Karlsbadener Sprudels, mit Rücksicht auf die Bildung des Sprudelinters.* Breslau, 1863.

⁽²⁾ Pouchet, *Nouvelles expériences sur la génération spontanée.* Paris, 1864.

⁽³⁾ Rend. dell'Istituto Lombardo di scienze e lettere. Dicembre 1865.

⁽⁴⁾ Rend. dell'Istituto lombardo di scienze e lettere. Classe di scienze mat. e nat. f. 7 e 8, vol. 2°, 1865.

⁽⁵⁾ Annali universali di medicina. Vol. 194, fascicoli di maggio e giugno, 1866.

⁽⁶⁾ *Esperienze sulla produzione dei vibrioni in liquidi bolliti.* Rend. Ist. lomb., classe di scienze mat. e nat., fasc. 8°, vol. 3°.

assoggettati alle anzidette prove, è la causa principale dei risultati negativi dello Spallanzani, del Cavalleri e di alcune prove del Pasteur.

Successivamente sottoposero ad osservazione palloncini di capacità più grande ancora e contenenti infusi organici pure più densi (brodo, decotto di zucca) alle temperature di 108°, 110°, 112°, 115° C. entro la pentola di Papin. Fino a 110° ottennero vibroni, a temperature superiori no. Pertanto il Cantoni deduce che aumentando la densità degli infusi organici e la quantità d'aria a contatto con essi si possono portare i medesimi a 110° e mantenerli a questa temperatura per 15 minuti senza che venga in essi impedito lo sviluppo di forme (Nota citata).

13. Wyman pubblicò nel 1867 i risultati di numerose sue esperienze sugli infusi di carne bolliti e difesi dall'aria ⁽¹⁾. Afferma che il brodo e la carne di bue tagliuzzata, posti con acqua zuccherata in vasi di vetro chiusi a fuoco e tenuti per un'ora e mezzo a 100°, diedero ancora bacteri, vibroni e monadi. L'estratto di Liebig nella medesima soluzione zuccherata, tenuto per 4 ore a 100°, diede pure vibroni. In una altra serie di esperienze ottenne bacteri e vibroni in infusi organici bolliti per 25 minuti e poi lasciati in contatto dell'aria passante per tubi arroventati.

14. Una lunga serie di esperienze analoghe eseguì il dott. Bennet ⁽²⁾ durante gli anni 1864, 1865 e 1867. Faceva bollire infusi molto diluiti di varie sostanze vegetali entro matracci capovolti, col collo immerso nello stesso liquido, contenuto in capsule di porcellana.

Vi introduceva poi aria per circa 3/4 della loro capacità, aria filtrata attraverso una serie di tubi contenenti cotone fioccoso, soluzione di potassa e pietra pomice con acido solforico. Faceva entrare nel collo del vaso un tappo di sughero a lungo bollito nello stesso liquido, poi tuffava il collo nella ceralacca liquida per suggellarlo. Lo sviluppo di vibroni si verificò sempre, ma in un periodo di tempo assai lungo, attesa la tenue densità degli infusi adoperati.

15. Il Cohn ⁽³⁾ sperimentò l'azione delle diverse temperature su decotti vegetali seminati con una goccia di bacteri.

Decotti di fagioli in acqua distillata, bolliti per un quarto d'ora, seminati con una goccia di bacteri, chiusi ermeticamente e tenuti a 45°, 55°, 60°, entrano in putrefazione dopo tre giorni. Innalzando la temperatura a 65° la putrefazione viene alquanto ritardata. A 75° una vera putrefazione non avviene più, ma il decotto diventa opalino e si forma un sedimento costituito da bacteri. A 80° ottenne ancora pochi bacteri ed un *penicillium*. Però l'autore fa notare che le temperature alte (da 60° ad 80°) durarono troppo poco, perchè i risultati sieno attendibili. Osserva ch'è specialmente il *Bacillus subtilis* che si sviluppa ad alta temperatura, determinando la fermentazione butirrica. Questa forma allungandosi assai, darebbe poi i filamenti del *leptothrix*. Il *Bacterium termo* si formerebbe solo a temperature relativamente basse.

16. Dalle ricerche di Horvath ⁽⁴⁾ risulta che nelle soluzioni normali di sali

(1) Siliman's Amer. Journ. 1877, settembre, p. 152 e seguenti.

(2) Edinburgh medical Journal. Marzo 1868.

(3) Untersuchungen über Bacterien. B. zur Biol. der Pflauzen, Zweites Heft. 1872.

(4) Beit. zur Biol. der Pflauzen, Zweites Heft, 1879.

minerali seminate di bacteri lo sviluppo cessa al di sopra dei 60° C. Tenendo le soluzioni ad una temperatura di 40°-50° lo sviluppo comincia entro 2-3 giorni.

17. Il dott. Eidam ⁽¹⁾ studiò nel laboratorio di Cohn il modo di comportarsi del *Bacterium termo* alle diverse temperature, seminato nella comune soluzione di sali minerali (fosfato acido di potassa, solfato di magnesio, tartrato neutro di ammoniaca, cloruro di calcio). Le sue conclusioni sono le seguenti: a temperature inferiori a 50° C. il *Bacterium termo* non muore, ma è paralizzato: la moltiplicazione comincia a 5°,5, mantenendosi debole fino a 10°: da 10° a 35° si fa sempre più abbondante: al di sopra di 35° cessa rapidamente: a 40° il *Bacterium* è paralizzato: a 60° morto. L'autore insiste sull'importanza della durata della temperatura e dimostra sperimentalmente che il *Bacterium termo* resiste per 14 ore ad una temperatura di 45° e per tre ore solo a quella di 50°.

18. In un'altra serie di ricerche sui bacteri ⁽²⁾ il Cohn ripete con qualche modificazione le esperienze di Roberts ⁽³⁾ e viene ai medesimi risultati di quest'ultimo; che cioè, adoperando diverse infusioni di fieno, se l'ebollizione non si protrae oltre i 15 minuti, i microorganismi si sviluppano costantemente. Ottanta ed anche cento minuti di ebollizione non sono sufficienti, secondo Cohn, per impedire lo sviluppo dei bacteri nelle infusioni di fieno. La divergenza fra Cohn e Roberts sta in ciò che il secondo sostiene essere sufficiente 5 minuti di ebollizione per sterilizzare una infusione naturale di fieno (acida), ed essere insufficiente una, due ed anche tre ore di ebollizione per sterilizzarne una neutralizzata, mentre il primo afferma che gli infusi acidi e neutri sono egualmente resistenti.

19. Tyndall ⁽⁴⁾ ha pure ripetuto le prove di Roberts e di Cohn conseguendo risultati ora in accordo ed ora in disaccordo con quelli dei due citati sperimentatori. Sostenne inoltre che le infusioni vegetali sono realmente sterili solo quando l'ebollizione dura da 240 a 350 minuti.

20. Sebbene eseguite allo scopo di contribuire alla risoluzione del problema dell'eterogenesi, pure dal nostro punto di vista, hanno grande importanza le numerose ed accurate esperienze di Cantoni, Balsamo Crivelli e Maggi, esposte in ben 14 Memorie nei Rend. dell'Ist. lomb. dal 1867 al 1878.

Il modo di sperimentare col ben noto palloncino a collo affilato di Spallanzani fu quello stesso precedentemente descritto nei cenni intorno alle ricerche di Mantegazza, Cantoni ed Oehl.

Le infusioni organiche adoperate, erano di farina, zucca, rapa, gelatina pura, sugo di carne, brodo Liebig, tuorlo d'uovo di pollo, latte, orina, latte acido neutralizzato, latte con soluzione di potassa, tuorlo d'uovo di pollo con acqua salata. Ciascuno di questi infusi veniva posto nel palloncino in quantità tale da occuparne circa $\frac{1}{10}$ del volume. Si teneva rigoroso conto del rapporto fra la sostanza organica e l'acqua distillata.

⁽¹⁾ *Die Einwirkung verschiedener Temperaturen und des Eintrocknens auf die Entwicklung von Bacterium termo.* Beit zur Biol. der Pflanzen, Drittes Heft, 1875.

⁽²⁾ Beit. zur Biol. der Pflanzen. Band II, 1877 (Beiträge zur Biologie der Bacillen).

⁽³⁾ *Studies on Biogenesis.* Phisiol. Trans. of the Society of London, vol. 164, II, p. 477, 1874.

⁽⁴⁾ Tyndall, *Les microbes*, 1882.

Le temperature di scaldamento dei palloncini furono di 100°, 105°, 107°, 108°, 109°, 110°, 111°, 112°, 113°, 114°, 115°, 116°, 117°, 118°, 120°, 121°, 125°, 130°, 150°. La temperatura di 100°, veniva raggiunta coll'acqua bollente o coll'apparecchio di Regnault per la dilatazione dei gas. Le temperature superiori ai 100° furono conseguite o colla pentola di Papin o collo scaldamento nell'olio d'olive.

La durata della temperatura di scaldamento fu di 5', 10', 15', 20', 25', 40', 60', 65'.

La temperatura dell'ambiente nel quale si lasciavano i palloncini dopo lo scaldamento variò gradatamente da 11° a 50°, e si esaminavano dopo un tempo più o meno lungo, variabile da 22 ore a 30 giorni.

21. I risultati di queste esperienze furono ultimamente riassunti in una pregevolissima Nota comparativa del prof. Maggi ⁽¹⁾.

Le condizioni favorevoli allo sviluppo dei microbi, nelle infusioni organiche, scaldate in palloncini chiusi da 100° a 150° C., sono:

1° che l'infusione organica sia fatta con sostanza di elevata costituzione organica e di composizione chimica quaternaria;

2° che l'infusione sia densa;

3° che il volume d'aria contenuto nel palloncino sia relativamente grande, cioè all'incirca dieci volte quello dell'infuso;

4° che lo scaldamento non sia superiore all'alta temperatura limite dell'infusione;

5° che la durata dello scaldamento sia minore per le infusioni diluite;

6° che la temperatura dell'ambiente in cui si conserva il palloncino dopo lo scaldamento sia non minore di un quarto o di un terzo del numero dei gradi della temperatura dello scaldamento stesso;

7° che la durata della temperatura ambiente sia maggiore per le infusioni diluite;

8° che le condizioni termiche non mutino lo stato fisico-chimico dell'infusione organica;

9° che la quantità di liquido menstuo per l'infusione organica non induca, sotto l'influenza delle condizioni termiche, nè trasformazione, nè disposizione della sostanza organica.

Trattando dell'azione del calore sui microorganismi ci si presenterebbero le questioni delle cosiddette sterilizzazioni, tanto usate specialmente nella bacteriologia patologica, e di cui la sterilizzazione discontinua è la più accreditata e generalmente usata. È noto che il grado di temperatura che uccide i microbi varia assai secondo che si tratta della forma vegetativa degli stessi, oppure dei loro organi di riproduzione (spore), i quali sono sempre molto più resistenti; è pure noto che il *calore umido* è assai più attivo dell'*asciutto*, per cui di quest'ultimo è necessario un grado di temperatura molto maggiore per distruggere i microbi.

Su questi fatti è fondata la sterilizzazione discontinua la quale consiste nel lasciar per due ore a 100° in bagno maria. il substrato nutritivo dei bacteri, ripetendo l'operazione da 5 ad 8 volte con intervalli di 24 ore; in tal modo verrebbero uccisi i bacteri esistenti nella materia organica e quelli che successivamente potrebbero derivare dalle spore non uccise dalla temperatura di 100°.

(1) *Sull'importanza delle temperature nello sviluppo dei microbi*. Boll. scient. n. 3, 4, 1884.

Noi non ci siamo occupati di sterilizzazioni per due principali ragioni: I. A noi non importava, in una ricerca di biologia generale, di studiare questa o quella forma batterica, seminandola nella sostanza di coltura; volevamo invece studiare le mutazioni che una data forma, comunque comparsa nelle nostre soluzioni, subisce col mutare delle condizioni fisiche delle medesime. II. La spiegazione, comunemente data, della sterilizzazione discontinua è ipotetica, perchè l'essere sterile una sostanza organica complessa sottoposta replicatamente ad una temperatura di 100°, potrebbe anche dipendere dal fatto che essa sostanza subisca, per quell'alta temperatura, tali disgregazioni in sistemi atomici più semplici da servire bensì di nutrimento alle forme seminate, ma da non potersi organizzare.

È una obbiezione vecchia, ma non si può eliminarla.

B. Influenza delle temperature inferiori allo zero termometrico.

22. Già Valentin e Purkinje avevano notato che l'epitelio vibratile della mucosa nasale e boccale della rana riprende la sua vivace vibrilità quando l'animale, che fu congelato, sia sottoposto al disgelo.

Prevost ⁽¹⁾ dimostrò che gli spermatozoi della rana riacquistano la loro mobilità quando l'animale sia sottoposto al medesimo trattamento sopraccennato.

23. Kühne ⁽²⁾ trovò che le amebe ed i globuli bianchi del sangue sospendono i loro movimenti nell'acqua ghiacciata: ma li ripigliano se questa viene riscaldata alquanto.

24. Roth ⁽³⁾, studiando l'epitelio vibratile, dedusse che si può portarlo ad una temperatura di — 4° C. senza che perda la sua caratteristica proprietà.

25. Engelmann ⁽⁴⁾ venne alle medesime conclusioni di Roth.

26. Schenk nelle sue ricerche sull'influenza dei bassi gradi di temperatura sopra alcuni organismi elementari ⁽⁵⁾ sperimentò sul sangue, sulle uova e sullo sperma di vari animali.

Portando il sangue dei tritoni a — 3°, — 5°, e — 7° C., poi scaldandolo lentamente col tavolino di Schultze, osservò che i globuli bianchi riprendono i loro moti amiboidi. Ciò per altro solamente quando il raffreddamento dura un tempo relativamente breve: protrahendolo, ad esempio per 8 ore, i moti amiboidi cessano. Pel sangue di coniglio, basta una temperatura di 3° C. che duri 10-15 minuti per estinguere i movimenti dei leucociti.

Le uova fecondate di rana, tenute per breve tempo a — 3° C., si sviluppano ancora. Se però la temperatura discende a — 7° lo sviluppo si arresta. Le uova di *Bufo cinereus*

(1) Comp. Rend. Novembre 1840.

(2) *Das Protoplasma*. Leipzig, 1864.

(3) *Ueber einige Beziehungen des Flimmer-epithels zum contractilen Protoplasma*. Virchow's Archiv, B. 37, 1866.

(4) *Ueber Flimmerbewegung*. Leipzig, 1868.

(5) Sitzungsberichte der kaiserlichen Akad. der Wissenschaften in Wien. 1869. Mathem. naturwissenschaftliche Classe, B. 60, Zweite Abtheilung.

non fecondate, tolte dal corpo della madre, furono assoggettate per un'ora ad una temperatura di -4° C. ed in seguito fecondate con sperma spremuto da un maschio. Poste nella incubatrice si svilupparono, sebbene più lentamente di altre che non furono raffreddate e sottoposte, nel resto, al medesimo trattamento. Lo sperma invece del medesimo animale, raffreddato a -3° e -7° C., perde la proprietà fecondante; riscaldato poi anche fino a -40° C. riacquista i movimenti, ma non la proprietà fecondante.

27. Horwath ⁽¹⁾ trovò che i bacteri coltivati sopra sostanze solide non muoiono portandoli gradatamente, con miscele frigorifere, fino a -18° C.

28. Pasteur ⁽²⁾ sottopose il bacillo del carbonchio e quello del colera dei polli ad una temperatura di -40° C. senza che ne risentisse danni considerevoli.

29. Pictet ed E. Yung ⁽³⁾ assoggettarono varie specie di microbi per 20 ore ad una temperatura di -70° C. data dall'evaporizzazione dell'acido solforoso liquido. Surrugato questo dall'acido carbonico solido, la temperatura durò per altre 88 ore a -70° , -76° C. Successivamente, per 20 ore, praticando la rarefazione sulla neve carbonica, la temperatura stette a -138° . Infine i tubi contenenti i microbi furono aperti ed abbandonati a se stessi perchè la temperatura si elevasse lentamente. Orbene, dopo un raffreddamento tanto intenso il *Bacillus anthracis* conservava completamente la sua virulenza, ed erano ancora integri e perfettamente viventi il *Bacillus subtilis*, il *Bacillus ulna*, il *Saccharomices cerevisiae*, ed il *vaccino*.

30. Riandando i precedenti cenni storici è facile rilevare come principalmente nelle esperienze di Cantoni, Oehl, Balsamo Crivelli e Maggi venga data la dovuta importanza, nello sviluppo dei microorganismi, ad alcune fondamentali condizioni fisiche, agenti, non isolatamente, ma contemporaneamente.

I chiarissimi autori stabilirono in modo netto e preciso che le soluzioni e le infusioni organiche, per essere fertili, devono avere una considerevole densità. Abbiamo già veduto come Cantoni attribuiva i risultati negativi delle prove di Spallanzani, Cavalleri e di alcune di Pasteur alla troppo tenue densità delle soluzioni organiche impiegate. Dimostrarono la stretta relazione che esiste fra la fertilità delle infusioni e la differenza fra la temperatura di scaldamento e quella dell'ambiente: dimostrarono inoltre l'importanza dell'elevatezza della temperatura di scaldamento, della durata della medesima e di quella dell'ambiente.

Chiarirono il modo di agire del calore sulla sostanza organica delle infusioni. Quando predomina la sostanza organica sull'acqua si ha mutazione dello stato fisico-chimico di quella; quando predomina invece l'acqua sulla sostanza organica, questa si dissocia.

L'azione del calore si esercita però specialmente sull'acqua, di cui la tensione del vapore che non solo si solleva dal liquido, ma ne riempie gli spazi intermolecolari, da 115° a 120° è più che tripla di quella verificantesi fra 80° e 85° , e quasi doppia di quella che si manifesta fra 95° e 100° . Per un sì rapido crescere delle forze

(1) Beit. zur Biol. der Pflanzen. Zweites Heft, 1872 (*Untersuchungen über Bacterien*).

(2) Comp. Rend., vol. 89, p. 1015, 1879.

(3) De l'action du froid sur les microbes. Comp. Rend., vol. 98, p. 717, 1884.

tensive, dice il Cantoni, le particelle delle sostanze grasse e delle proteiche, nuotanti nell'acqua, si ridurranno più facilmente in particelle minori e giungeranno a quella tenuità di mole, per la successiva disgregazione, ed a quella sentita differenza di ritmo vibratorio, per cui può sorgere il moto browniano più spiegato, ed aversi pure quello stato di estremo disgregamento delle sostanze organiche chiamato da noi dissociazione, e che segna il limite di sviluppo dei microbi in ciascuna infusione organica.

I sullodati autori attribuirono molta importanza anche alla considerevole quantità d'aria, che nei palloncini è contenuta, a contatto della sostanza organica. Ma i panspermisti qui potrebbero obiettare che il maggiore sviluppo dei microorganismi non è già dovuto al volume relativamente grande dell'aria, considerato dal punto di vista fisico-chimico, ma alla maggior quantità di germi, che in quell'aria si trovano e che non sono uccisi, perchè il calore sufficiente per distruggere le materie in sospensione in un liquido probabilmente non basta, quando i germi sono diluiti in un gas od in un vapore (1).

C. Influenza dell'elettricità.

31. Già sulla fine del secolo scorso il Beccaria (2) aveva dimostrato sperimentalmente che la scintilla elettrica non uccide gli infusori.

32. M. Schultze (3), facendo agire le correnti continue sui peli della *Tradescantia*, osservò che nelle cellule pilifere, disponendosi sulla direzione della corrente, il movimento del protoplasma si arresta immediatamente, mentre in quelle, che si dispongono perpendicolarmente alla direzione della corrente, il movimento protoplasmatico si mantiene. Questi effetti si otterrebbero però solamente colle correnti elettriche molto forti; le deboli sarebbero inefficaci.

33. Yürgensen (4), sperimentando sui peli della *Vallisneria*, venne ai medesimi risultati di Schultze.

34. Secondo Brücke (5), il quale sperimentò sui peli dell'*Urtica urens*, il primo fatto che si osserva, appena chiuso il circuito, è la formazione di una più o meno grande quantità di fili, che fanno comunicare il corpo cellulare colla sostanza intercellulare; fatto questo non constatato dallo Schultze (6).

35. Schiel (7) eseguì pure una serie di ricerche intorno all'influenza delle correnti elettriche sulle soluzioni contenenti schizomiceti. I suoi risultati sono i seguenti: a) i funghi fermenti sono insensibili alle correnti anche forti; b) I batteri di un'infusione

(1) Tyndall, *Les microbes*, 1882, p. 206.

(2) Spallanzani, *Opuscolo di fisica animale e vegetale*.

(3) Op. cit. p. 43, 44.

(4) Studien des physiol. Inst. zu Breslau, herausgegeben v. Heidenheim, Erstes Heft, pag. 93, 1861.

(5) Das Verhalten der sogenannten Protoplasmaströme in den Brennhaare von *Urtica urens* gegen die Schläge des Magnetelectromotor. Sitzungsber. der Ak. der Wiss. zu Wien, 1862, B. 43, 5, 1.

(6) Op. cit. p. 45.

(7) *Electrotherapeutische Studien*. Deutsches Archiv für klinische Medizin, B. 15, pag. 190-194.

di fuorlo d'uovo, sottoposti ad una corrente energica, perdono dopo mezz'ora il movimento e non lo riprendono nemmeno dopo 24 ore dalla cessazione della corrente; c) i batteri della putrefazione della carne sono indifferenti ad una forte corrente d'induzione, che duri solo 5 minuti; però una corrente indotta, mantenuta da 6 elementi Bunsen e che duri 10 ore, sospende ogni movimento delle cellule batteriche; d) i batteri coltivati nella soluzione di Pasteur hanno rallentato il movimento, ed anche sospeso, per una forte corrente d'induzione; rimangono invece quasi insensibili alla corrente continua; e) sottoponendo una miscela batterica di carne e liquido Pasteur per 24 ore alla corrente di 2 Bunsen il movimento viene sospeso, e non si riprende nemmeno dopo 24 ore dalla cessazione della corrente.

Quanto allo sviluppo dei germi Schiel ammette che una debole corrente sia sufficiente per impedirlo.

36. Ma le esperienze finora più complete sull'azione dell'elettricità nello sviluppo dei microorganismi sono quelle di Cohn e Mendelsohn (1). In un ordinario tubo di assaggio di 15 mm. di diametro ponevano 10 cc. di liquido nutritivo minerale seminato con una goccia di batteri. Nel liquido erano immersi i due elettrodi, costituiti da due lamine di platino giungenti fino sul fondo del tubo, il quale veniva poi tenuto alla temperatura presso che costante di 30° C. insieme con un altro contenente un'identica soluzione non elettrizzata, che serviva di paragone. Adoperarono dapprima una corrente debole, data da un solo elemento Daniell. Dopo 24 ore entrambe le soluzioni erano torbide e formicolavano di batteri. Sostituirono all'elemento Daniell un elemento Marié-Davy, ma il risultato fu quasi identico. Colla corrente di 2 elementi Marié-Davy la sterilizzazione è completa, quanto a batteri, al polo positivo, incompleta al negativo. I batteri sono immobili, ma non uccisi, perchè portati in una soluzione normale si moltiplicano rapidamente. S'intende che la durata dell'azione elettrica fu pure di 24 ore e la temperatura dell'ambiente 30° C. Adoperarono in seguito 5 elementi Marié-Davy per 24 ore, e, restando la temperatura quasi costante a 30 c., ottennero completa sterilizzazione ad ambo i poli con morte dei batteri, perchè portati nella soluzione normale non si svilupparono più; inoltre, seminando altri batteri nel liquido elettrizzato, vi perirono. Fecero poi agire sulla stessa soluzione minerale normale seminata di batteri le correnti d'induzione, ma l'effetto fu nullo.

Dedussero quindi Cohn e Mendelsohn: 1° che le correnti continue possono arrestare lo sviluppo dei batteri ed anche ucciderli, quando abbiano una considerevole intensità; 2° che le correnti d'induzione non hanno alcun potere sterilizzante sulle soluzioni batteriche.

37. Dal punto di vista critico notiamo come della densità delle soluzioni elettrizzate non si sia tenuto calcolo da nessuno. L'intensità della corrente non fu rigorosamente misurata, sapendosi che non si può dedurla dal numero degli elementi impiegati. Anche la temperatura dell'ambiente, nel quale si eseguirono le esperienze, fu troppo trascurata, se si fa eccezione delle ricerche di Cohn e Mendelsohn.

(1) *Ueber Entwicklung des electrischen Stromes auf die Vermehrung von Bacterien*. Beit. zur Biologie d. Pflanzen. B. 3, Erstes Heft, 1879.

D. *Influenza della luce.*

38. Sono noti i lavori di Strasburger e di Engelmann sui movimenti, sugli scambi gassosi e sulle elaborazioni pigmentali che presentano gli organismi semplici nei raggi dello spettro.

39. Van Tieghem nello sviluppo del *Penicillium glaucum* e Zopf in quello della *Beggiatoa alba* dimostrarono pure la notevole influenza della luce su questi organismi.

40. Schroeter ⁽¹⁾ sostenne che la luce non è necessaria per la vita degli schizomiceti cromogeni ammettendo però che l'elaborazione dei pigmenti sia più copiosa nella luce che nell'oscurità.

41. A. Downes e P. Blunt dimostrarono che i raggi solari esercitano un'azione ritardatrice sullo sviluppo dei batteri della putrefazione e che i germi di questi batteri sono distrutti in un liquido esposto al sole per un certo tempo ⁽²⁾.

42. Duclaux ⁽³⁾ ha cercato di determinare sperimentalmente quale sia l'influenza propizia del sole nella distruzione dei germi dei microbi. Studiò specialmente il *Tyrophthrix scaber* che vegeta bene nel latte e meglio nel brodo Liebig. Una gocciolina di una coltura di questo microbio, presa al momento della formazione delle spore, veniva posta sul fondo di un matraccio, chiuso poi con un tappo di cotone. Evaporata la goccia, il matraccio veniva esposto al sole d'estate per 15 giorni ed altri matracci, egualmente preparati, per uno e due mesi. Orbene! mentre le spore conservate a secco nella stufa, ad una temperatura eguale alla massima ottenuta al sole, rimangono attive anche dopo tre anni, quelle esposte al sole sono uccise quasi completamente dopo due mesi d'azione. Le spore ottenute colla coltura nel brodo Liebig sono uccise da un'insolazione di solo 15 giorni in un matraccio su tre preparati, da un'insolazione di un mese in due matracci su tre, da un'insolazione di due mesi in tre matracci su tre.

43. Le esperienze di Arloing ⁽⁴⁾ intorno all'azione della luce artificiale sul *Bacillus anthracis* furono eseguite in una camera oscura colla luce fornita da forti lampade a gas a doppia corrente. Le colture del bacillo in brodo di pollo scolorito venivano collocate in una stufa di Gay-Lussac, opportunamente modificata, ed assoggettate all'oscurità, alla luce bianca, alle luci colorate, in serie distinte, per modo da poter istituire gli opportuni raffronti. Arloing concluse che l'assenza o la presenza della luce artificiale bianca o colorata non determina una differenza profonda nella vegetazione del *Bacillus anthracis*; però la sporificazione è più rapida ed abbondante nell'oscurità e nei raggi più rifrangibili dello spettro.

44. Duclaux ⁽⁵⁾ ha determinato anche l'influenza della luce solare sulla vitalità di

⁽¹⁾ *Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmente.* Beit. z. Biol. der Pflanzen, Zweites Heft, 1872.

⁽²⁾ *Proceedings of the royal Society*, 1877.

⁽³⁾ *Influence de la lumière du soleil sur la vitalité des germes des microbes.* Comp. Rend. 1^o sem., p. 119, 1885.

⁽⁴⁾ *Influence de la lumière sur la végétation et les propriétés pathogènes du bacillus anthracis.* Comp. Rend. 1^o sem., pag. 450, 1885.

⁽⁵⁾ *Influence de la lumière du soleil sur la vitalité des micrococci.* C. R. 2^o sem., p. 395, 1885.

alcuni micrococchi tolti da prodotti patologici (foruncolo, follicolite agminata, ecc. ecc.). Le colture in brodo neutro di vitello sarebbero uccise da un'insolazione di 15 giorni di luglio. Se sono a secco bastano ad ucciderli tre giorni, due giorni, e spesso anche poche ore d'insolazione.

Sulla vegetazione, la vegetabilità e la virulenza del *Bacillus anthracis*, esposto all'azione della luce solare, Arloing eseguì due nuove serie di esperienze. I raggi del sole venivano mandati da un eliostato sui matracci contenenti le colture: al tramonto del sole i matracci erano posti in una ghiacciaja, per esporli nuovamente al levare dell'astro. L'autore dedusse da queste osservazioni: che la vegetazione del microbio del carbonchio è rallentata, ma non impedita, dalle radiazioni solari; che la vegetabilità venne gradatamente scemando fino a cessare per l'azione di 25-30 ore del sole di luglio ad una temperatura di 30°-36° C.: che dopo 30 ore di insolazione l'attenuazione è completa, e le colture sono diventate vacciniche (¹).

45. A proposito delle accennate ricerche sull'influenza della luce, e specialmente della solare, nello sviluppo dei microorganismi sembra a noi che i risultati non sieno del tutto attendibili, perchè non si sono distinte ed isolate in modo rigoroso le vibrazioni luminose dalle termiche. Due matracci contenenti la medesima coltura vengono posti, l'uno sotto le radiazioni termo-luminose del sole ad una temperatura di 30°-36° C., l'altra nella stufa, al bujo ed alla medesima temperatura. La differenza nello stato delle due colture, dopo un dato tempo, rappresenterà l'azione delle radiazioni luminose, perchè la temperatura era identica. Su questo ragionamento, solo apparentemente esatto, sono fondate le esperienze e le conclusioni precedentemente esposte.

E. Influenza dei diversi ambienti gassosi.

46. È nota a tutti la distinzione degli schizomiceti in aerobi ed in anaerobi a seconda che vivono in presenza dell'aria o fuori del contatto di questa. Degli elementi dell'aria è incomparabilmente più importante, dal punto di vista biologico, l'ossigeno. Tyndall ha dimostrato che le soluzioni organiche, a cui si è sottratto l'ossigeno coll'ebollizione o colla rarefazione, sono assai più facilmente sterilizzate col calore. Ha dimostrato inoltre che i microorganismi, in presenza di un eccesso di ossigeno, devono perire (²).

Pasteur ammette che i batteri delle fermentazioni sieno indeboliti, nelle loro attitudini, dalla presenza di ossigeno libero.

Però Schützenberger prima, poi Naegeli (1879), Nenky (1880) ed Hoppe-Seyler (1881) dimostrarono che l'asserto di Pasteur è inesatto. Assodarono però anche il

(¹) Altre ricerche di Arloing (*Les spores du bacillus anthracis sont réellement tuées par la lumière solaire*, Comp. Rend. de l'Académie des Sciences, 1887, 1^o sem., p. 701) dimostrarono che le spore del bacillus anthracis dopo 4 a 5 ore di insolazione muoiono anche se la temperatura, come nelle esperienze fatte in febbraio, non supera gli 11° C. Arloing ribatte quindi l'asserzione di Nocard (*Recueil de Médecine vétérinaire*, 1885), di Duclaux (*Microbes et maladies*) e di Strauss (*Société de Biologie*, 1886) che l'insolazione uccide i giovani miceli e non le spore.

(²) Tyndall, *Les microbes*, p. 237, 250, 1882.

fatto che parecchie specie di schizomiceti vivono e si sviluppano senza ossigeno. D'altra parte fin dal 1877 Jeanneret, in un lavoro fatto nel laboratorio di Nenky provò in modo assoluto che la presenza dell'ossigeno libero rende molto più attivo il processo di putrefazione. Provò inoltre che l'acido carbonico e l'azoto arrestano, almeno per qualche tempo, questo processo ⁽¹⁾.

Brieger ne' suoi recenti lavori sui prodotti aromatici della putrefazione dell'albmina confermò le osservazioni di Jeanneret ⁽²⁾.

F. Influenza della pressione.

47. Non abbiamo potuto eseguire ricerche sull'influenza della pressione, essendoci mancati i mezzi; epperò ci dispensiamo dal ricordare i risultati ottenuti per tale riguardo da illustri sperimentatori, quali Paul Bert, Certes, Regnard ecc. ecc.

III.

Ricerche sperimentali.

A. Materiale impiegato e precauzioni generiche.

1. Le sostanze da noi adoperate, per preparare le soluzioni da sottoporre alle diverse influenze fisiche, furono: il comune estratto di carne del Liebig, la gelatina purissima, il peptone ed il tuorlo d'uovo.

2. Queste sostanze non le abbiamo mai mescolate. Di ciascuna di esse abbiamo preparato una serie di soluzioni di diversa densità ed ogni serie poi serviva per una data ricerca.

Le soluzioni erano contenute in tubi d'assaggio della lunghezza di 15 cm. e del diametro di 2 cm.

La quantità di soluzione posta in ciascun tubo era di 25 cc.

L'acqua impiegata veniva distillata sul permanganato di potassa e tenuta in bottiglie perfettamente pulite ed ermeticamente chiuse.

I tubi d'assaggio, dapprima lavati con acido solforico, venivano ripetutamente sciacquati coll'acqua distillata, e quindi asciugati ed arroventati alla lampada. Dopo averli poi risciacquati di bel nuovo con acqua distillata, eravi versata la soluzione, che veniva fatta bollire a lungo mentre il tubo era tappato con cotone purissimo.

(1) Liborius (Zeitschr. f. Hygiene, Vol. I^a) ha resa più completa la conoscenza relativa al bisogno che gli organismi inferiori hanno di ossigeno, dimostrando specialmente che i funghi anaerobii possono esistere e svilupparsi senza produrre fermentazioni. Queste ricerche permettono di riunire gli schizomiceti in tre gruppi: 1° *anaerobii obbligati* che non si sviluppano in presenza di ossigeno; 2° *anaerobii facoltativi* il cui sviluppo è ritardato, ma non impedito dalla presenza di ossigeno; 3° *anaerobii obbligati* che si sviluppano solo in contatto coll'ossigeno.

(2) *Bakterien, Plasmagen und Krankheiten*, Berlin 1877.

B. *Densità delle soluzioni.*

3. Non abbiamo creduto opportuno di determinare il peso specifico delle soluzioni impiegate, poichè, precipitando nel corso delle esperienze parte della sostanza organica, la densità veniva continuamente variando. Abbiamo quindi preferito di riferirne il rapporto ponderale fra l'acqua distillata e la materia organica adoperata.

In sette provette, cioè, distinte coi numeri progressivi dall'1 al 7, ponevamo, sopra 25 cc. di acqua distillata, rispettivamente grammi 0,125, 0,25, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, e 12,00 di sostanza organica. Sicchè la ricchezza procentica delle soluzioni, contenute ordinatamente nella 1^a, 2^a, 7^a provetta, era rispettivamente di $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4, 10, 20, 48. Però, convinti poi, dalle prime serie di esperienze, che le soluzioni n. 6 e 7, erano eccessivamente ricche di sostanza organica, le abbiamo abbandonate.

C. *Ricerche sull'influenza della temperatura.*

a) Metodi impiegati per conseguire le varie temperature e mantenerle costanti.

4. Per ottenere una data temperatura costante per molto tempo, ebbero dapprima ricorso a quegli apparecchi, destinati alle colture dei microorganismi, che con nome poco veritiero, chiamansi *termostati*. Ma per le temperature alquanto elevate li abbiamo abbandonati, imperocchè la variazione di temperatura in tali strumenti eccede sempre di gran tratto i limiti imposti ad una buona ricerca. Cosicchè per le temperature comprese fra 0° e 50° ci servimmo di un grande vaso calorimetrico di rame, della capacità di circa 12 litri (altezza 40 cm., diametro 20 cm.) e ben terso all'esterno. Esso fu ripieno di acqua, sulla quale venne versato uno strato di olio di ulive per l'altezza di circa un centimetro, e fu posto in una grande sala, dove la temperatura non variava di molto lungo il dì. L'irradiazione del vaso calorimetrico era così ridotta minima e presso che costante; di guisa che con una fiammella a gas, regolata due o tre volte in un'intera giornata (per compensare le variazioni di temperatura della sala), si poté mantenere nel bagno una voluta temperatura, compresa fra i detti limiti, la quale ben di rado assai giunse a variare di un grado.

Le temperature poi erano date da alcuni termometri a mercurio, divisi in quinti di grado, di cui ci assiecurammo, mediante opportuni confronti con un termometro campione, che l'errore non eccedesse un decimo di grado, da che un'approssimazione maggiore sarebbe stata inutile.

5. Per le temperature comprese fra 50° e 100°, usammo di un apparecchio consimile a quello adoperato da Wiedemann, come apparecchio riscaldante, nelle ricerche calorimetriche (fig. 1).

È un vaso cilindrico di rame a triplice parete, di cui l'altezza è circa 25 cm. ed il diametro esterno di 18 cm.

Nello spazio interno *a* (diam. 8 cm.) sono riposte le provette colle soluzioni organiche, e vengono appoggiate sopra un disco di sughero *c*. Lo spazio *a* è chiuso da un coperchio *d*, pure di rame, che entra per breve tratto, a mo' di tubo da canocchiale,

in *a*. In esso è impegnato un cilindro di sughero, che si protende all'infuori del coperchio stesso e chiude per bene lo spazio *a*. Il coperchio poi porta un foro nel quale è impegnato, con un tappo di sughero, un termometro *t*.

Lo spazio *bb*, largo 6 cm., è ripieno d'acqua, che vi è versata dal tubo *f* e può essere spillata dal rubinetto *g*. Finalmente nello spazio *cc*, largo 4 cm., vien fatto

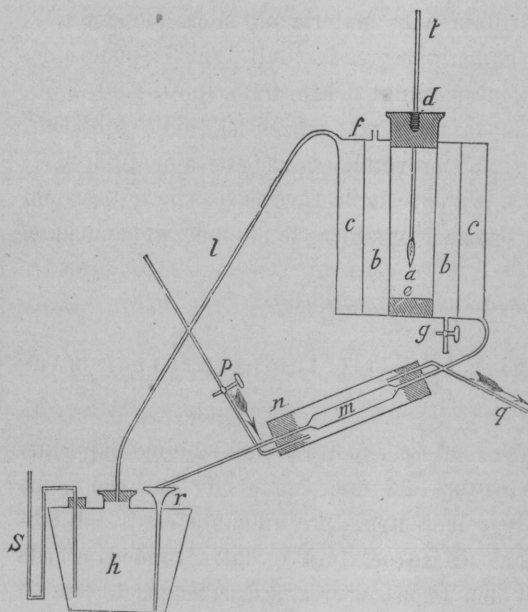


Fig. 1.

circolare il vapore di un liquido bollente a quella temperatura, cui si desidera portare e mantenere le soluzioni organiche. Il vapore è generato nella caldaja di rame *h*, e mediante il tubo *l*, è condotto nello spazio *cc*; donde, dopo avervi circolato, passa a condensarsi nel refrigerante *m*, intorno al quale è mantenuta una corrente d'acqua fredda, che entra nel manicotto *n* pel tubo *p* ed esce poi per *q*. Il vapore liquefatto ritorna quindi lungo il tubo *r* nella caldaja, la quale è munita di un livello a sifone *S* per rilevare a quale altezza vi si trova il liquido; imperocchè, dovendo l'apparecchio funzionare per molti giorni di seguito ed essendo inevitabile qualche piccola perdita di vapore, è prudente cosa il poter constatare di giorno in giorno il livello del liquido nella caldaja.

Così, una volta riscaldata alla temperatura d'ebollizione del liquido la massa d'acqua riposta in *bb*, essa è mantenuta continuamente a quella temperatura del vapore circolante in *cc*, e per tal via si può eziandio mantenere nello spazio *a* una temperatura perfettamente costante, la quale, anche per quindici dì, non varii che di qualche decimo di grado.

6. Per le temperature superiori a 100°, non essendosi prolungato il riscaldamento per una data temperatura al di là di tre o quattro ore, si seguirono due vie. Dapprima le soluzioni organiche vennero riscaldate nella pentola di Papin; ma questa richiede una continua sorveglianza, se non si vuole che la temperatura varii più di un grado. Per questo riscaldammo in seguito le soluzioni in tubi capillari di vetro, suggellati alla fiamma, che erano della lunghezza di 25 cm., del diametro interno di 3 mm. e dello spessore pure di 3 mm. e contenevano le soluzioni medesime per l'altezza di circa 6 cm. Essi stavano sospesi in una cestella metallica *c* nell'ebollitore *e* dell'apparecchio di Meyer, destinato alla determinazione delle densità dei vapori (fig. 2). Un po' di glicerina acquosa, convenientemente preparata, veniva mantenuta in ebollizione da una lampada a gas; e perchè non variasse il titolo della soluzione glicerica, l'ebollitore era coperto con una lastra *v* di vetro.

Con questo metodo fu assai più facile e comodo di mantenere costante ad una temperatura elevata le soluzioni organiche in esame, senza che esse entrassero in ebollizione.

7. Per le basse temperature abbiamo ricorso al ghiaccio fondente ed ai comuni miscugli frigoriferi. Quando però si voleva una temperatura costante e per lungo tempo, il miscuglio frigorifero era soltanto impiegato per raffreddare un miscuglio salino criodrato, in cui erano tenute immerse le provette contenenti le soluzioni organiche. Se il raffreddamento non doveva durare a lungo, le provette erano direttamente immerse nei miscugli frigoriferi. Una volta sola, in tutte le esperienze stabilite a basse temperature, le soluzioni organiche vennero raffreddate mediante l'evaporizzazione dell'acido solforoso liquido; da che, come è detto più innanzi, dallo zero termometrico all'ingiù non si presentò mai alcun sviluppo di forme organiche nelle soluzioni.

b) Soluzioni di estratto di Liebig.

Esame delle soluzioni mantenute a 0°.

8. Le soluzioni n. 1, 2, 3, 4, 5 furono mantenute per 10 giorni alla temperatura del ghiaccio fondente; ed esaminate di poi si osservò che: sono affatto limpide; hanno un leggero odore di brodo; non presentano alcuna forma di microorganismi.

9. Le soluzioni vennero di poi rimesse nel ghiaccio fondente per altri 8 giorni e diedero ancora lo stesso reperto.

Esame delle soluzioni mantenute a 5°.

10. Le soluzioni vennero osservate dopo averle mantenute alla temperatura di 5° per 11 giorni. Si notò:

Soluzione n. 1. La superficie del liquido è coperta da una sottilissima pellicola, bianchiccia e semitrasparente. Lungo la colonna liquida si diffonde una leggera nubecola a spirale. Un deposito biancastro, soffice, è depositato sul fondo. Il microscopio rivela uno sviluppo discreto della varietà più corta del *Bacillus subtilis* Cohn. È rarissima la varietà lunga ed incurvata. Il deposito è costituito per la maggior parte dagli stessi bacilli e da granuli organici amorfi.

Soluzione n. 2. Presenta il medesimo aspetto della precedente. Il *Bacillus subtilis* vi si trova in forme più lunghe, ma è meno copioso.

Soluzioni n. 3, 4 e 5. Manca la pellicola superficiale; ma esiste la nubecola a spirale ed il deposito, costituiti da granuli amorfi di grandezza variabile. Non vi sono microorganismi.

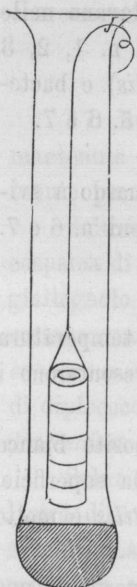


Fig. 2.

Esame delle soluzioni mantenute a 10°.

11. Le soluzioni, mantenute alla temperatura di 10° ed esaminate a diversi intervalli di tempo, diedero i seguenti risultati.

Dopo due giorni:

Soluzioni n. 5, 6, 7. Sono affatto limpide, e non offrono al microscopio che le normali granulazioni del brodo Liebig.

Soluzioni n. 1, 2, 3 e 4. Sono limpide e presentano numerosissime granulazioni. Alcune sono irregolari, ma la maggior parte sono regolari, rotonde, del diametro

dei comuni micrococchi. Vibrano di moto browniano. Sono libere, oppure riunite a due a due od anche in catenelle. Si presenta qualche raro esemplare del *Bacillus subtilis*, il quale è immobile, ma aumenta gradatamente in numero dalla soluzione n. 1 alla soluzione n. 4.

12. Dopo quattro giorni:

Soluzioni n. 1 e 2. Sono limpide, senza pellicola superficiale e senza deposito. Le granulazioni sferoidiche, divenute più abbondanti, hanno assunto i caratteri dei veri micrococchi, e sono in preda a vivace moto browniano. Sono frequenti i diplo e gli streptococchi. Il *Bacillus subtilis* (varietà corta) è abbastanza raro, come pure il *Bacterium termo* ed un bacterio distintamente virgolare.

Soluzione n. 3. Vi è una quantità considerevole di micrococchi anche allo stadio di diplo e streptococchi. Sono rarissime le forme batteriche e mancano le bacillari.

Soluzione n. 4. Vi abbondano i micrococchi; mancano affatto i bacteri ed i bacilli.

Soluzioni n. 5, 6, 7. V'hanno unicamente delle granulazioni amorfe. Nessuna forma viva.

13. Dopo sei giorni:

Le soluzioni conservano i caratteri fisici e microscopici che presentavano nelle osservazioni dopo quattro giorni. Devesi però notare che nelle soluzioni n. 1, 2, 3 e 4 sono aumentate considerevolmente le forme bacillari (*Bacillus subtilis*) e batteriche (*Bacterium termo*). Se ne trovano alcune anche nelle soluzioni n. 5, 6 e 7.

14. Dopo nove giorni:

Le soluzioni dell'ultima osservazione offrono leggeri mutamenti, riguardo a sviluppo di schizomiceti. V'hanno alcune cellule di saccharomiceti nelle soluzioni n. 6 e 7.

Esame delle soluzioni mantenute a 16°.

15. Le soluzioni vennero mantenute per 13 giorni consecutivi alla temperatura di 16° e furono osservate due volte. La prima volta, dopo 6 giorni, presentarono i seguenti caratteri:

Soluzione n. 1. La colonna liquida è opalescente. Vi è un leggero deposito bianco e granuloso sul fondo, ed una sottile pellicola, semitrasparente, viscida alla superficie. Non si avverte alcun odore; havvi invece reazione acida. Il *Bacillus subtilis* è molto copioso nella sua forma lunga e non mancano le forme ad ansa.

Soluzione n. 2. La soluzione è più torbida della precedente ed è coperta da una pellicola più grossa è più viscida, opaca e biancastra. Non presenta odori speciali ed ha reazione acida. Vi è abbondante la forma corta del *Bacillus subtilis* ed in specie quella del *Bacterium termo*.

Soluzione n. 3. La soluzione è limpida ed acida. Vi è qualche raro bacillo mobilissimo della varietà corta del *Bacillus subtilis*.

Soluzioni n. 4 e 5. Le soluzioni sono limpide ed acide. Non contengono alcun microorganismo.

16. La seconda volta, dopo 13 giorni, si osservò:

Soluzione n. 1. La soluzione è completamente torbida, opalescente. Vi è un deposito biancastro e granuloso sul fondo, ma nessuna pellicola alla superficie. Manda odore di sostanza rancida ed ha reazione acida. Vi si riscontra in quantità discreta

il *Bacillus subtilis* (varietà lunga, senza spore), abundantissimo il *Bacterium termo* e raro, isolato e grosso, un micrococco.

Soluzione n. 2. La soluzione ha la superficie coperta da uno strato giallo-aranciato, grosso e denso, che precipita al fondo agitando il liquido. È torbida la soluzione, con deposito bianco giallognolo e pesante sul fondo. L'odore è di sostanza rancida ed ha vi reazione acida. Vi è abundantissimo il *Micrococcus aurantiacus* ed il *Bacterium termo*.

Soluzione n. 3. La soluzione è coperta da uno strato giallo-aranciato più grosso e denso del precedente. Il deposito sul fondo è altresì più copioso. Sotto ogni altro riguardo la soluzione dà gli stessi risultati della precedente n. 2.

Soluzione n. 4. La soluzione è torbida; coperta da uno strato bianchiccio e viscido, non molto grosso. Ha odore di materia rancida e presenta reazione acida. Vi sono qui pure un micrococco ed il *Bacterium termo*, in grande copia.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida; con leggero strato superficiale ed un deposito bianchiccio sul fondo. V'abbonda un micrococco, sì libero che associato in diplo e streptococchi.

In quest'ultime tre soluzioni, n. 3, 4, 5, si osservarono altresì cellule di saccharomiceti.

Altro esame di soluzioni mantenute a 16°.

17. Le soluzioni, di cui fu riferito l'esame ai n. 8 e 9, dopo di essere state mantenute per 18 giorni a 0°, furono portate alla temperatura di 16° cui furono mantenute per 16 giorni consecutivi. Esaminate di poi, presentarono i seguenti fatti:

Soluzione n. 1. La soluzione è opalina; coperta da una pellicola biancastra e cosparsa di goccioline giallo-chiare alla superficie; sul fondo vi è un leggero deposito giallognolo, da cui diffondesi verso l'alto una nubecola semitrasparente. L'odore è di sostanza rancida, e la reazione è acida. Le goccioline gialle sono formate dal *Micrococcus aurantiacus*, che vi si trova nelle diverse condizioni di micrococco libero, di diplococco, di streptococco e di stafilococco. La pellicola biancastra è formata dal *Bacterium termo* in forme diverse.

Soluzione n. 2. La soluzione è opalescente; coperta da una pellicola bianco-giallastra discontinua. Vi è deposito giallastro sul fondo, e si avverte un odore di sostanza rancida. La reazione è acida. Il *Micrococcus aurantiacus*, nei vari stadi accennati, è commisto col *Bacterium termo*.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbida, biancastra; coperta da una pellicola superficiale grossa, a fondo biancastro e cosparsa di goccioline gialle. Vi è deposito copioso sul fondo, da cui diffondesi un'ampia nube irregolare e semitrasparente. L'odore è spiccatamente di sostanza rancida, e la reazione è acida. Le forme organiche sono le stesse delle soluzioni n. 1 e 2, nonchè qualche bacillo (*Bacillus subtilis*) isolato ed in catenelle.

Soluzione n. 4. La soluzione è torbida; la pellicola superficiale è grossissima, bianca, resistente ed elastica, sì che poté essere sollevata di un pezzo colla pinza; il deposito sul fondo è copioso; l'odore ricorda quello dell'infuso di ipecaquana. Il grosso strato superficiale è costituito da un fitto intreccio di miceli, con numerosissime spore (*penicillium*).

Soluzione n. 5. La soluzione offre gli stessi caratteri della precedente (n. 4). Il micoderma è più grosso e più bruno; del resto il reperto è lo stesso del precedente.

Esame delle soluzioni mantenute a 27°.

18. Le soluzioni furono mantenute alla temperatura di 27° per 4 giorni e furono osservate due volte. Si notarono le cose seguenti:

Dopo due giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida; non ha pellicola superficiale, nè deposito. Presenta un odore normale ed una reazione acida. Vi si trova il *Bacillus subtilis* abbastanza copioso, con prevalenza della varietà corta.

Soluzione n. 2. Nella soluzione sono diffuse piccole masse giallognole. V'ha un deposito leggero sul fondo ed uno strato superficiale abbastanza grosso e polverulento. L'odore accenna a divenir cattivo, e la reazione è acida. Vi è una straordinaria quantità di bacilli corti, riuniti in lunghissime e tortuose catenelle. Le catenelle sono assai vicine fra loro e disposte parallelamente, così da formare delle bendelle sinuose (1).

Soluzione n. 3. La soluzione è opalescente. Vi è sul fondo depositata una pellicola leggera che si solleva alla più piccola agitazione della soluzione. Lo strato alla superficie è omogeneo, iridescente, con fondo biancastro: esso è molto resistente, ma più sottile del precedente. L'odore che si avverte, tende al putrido, e la reazione è acida. Il *Bacillus subtilis*, nella sua varietà media, in catene lunghe e tortuose, è la forma organica che esclusivamente si presenta.

Soluzione n. 4. La soluzione è limpida; coperta da uno strato grosso, rugoso, bianco. Ha odore putrido ed ha reazione acida. Vi si trova una quantità immensa di piccoli bacilli (*Bacillus subtilis*) isolati ed in catenelle. Vi sono cocchi di piccola e media grandezza (micro e mesococchi) e copioso è pure il *Bacterium termo* in diverse forme, tra le quali, una isolata colle colture assomiglia al *bacillus fluorescens liquefaciens*.

Soluzione n. 5. La soluzione presenta lo stesso aspetto della precedente (n. 4): però lo strato superficiale è più grosso ed aggrinzato, resistente e vischioso. Vi si riscontra una glia reticolata fra le maglie della quale abbonda il *Bacterium termo* ed il *Bacillus subtilis* (varietà piccola).

19. Dopo 4 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione presenta un micoderma biancastro, anulare, rasente al vetro della provetta. Essa è leggermente opalescente. Vi è poco deposito sul fondo. L'odore accenna a divenir cattivo, e la reazione è acida. Il *Bacillus subtilis* abbonda, prevalendo la varietà lunga. Sono pure numerosi i filamenti di *Leptothrix*.

Soluzione n. 2. La soluzione è torbida, con uno strato superficiale bianco, grasso, squamoso, il quale per leggera agitazione si rompe e precipita al fondo. Sul fondo v'ha un deposito biancastro e granuloso. L'odore è cattivo. Del *Bacillus subtilis* vi è una quantità stragrande di spore, molte sono mobili e si colorano alquanto; sicchè non si possono differenziare da alcune forme del *Bacterium termo*. Il *Bacillus subtilis* è completamente scomparso.

(1) Abbiamo riferito queste forme al *Proteus mirabilis* anche per l'abbondanza delle forme di involuzione.

Soluzione n. 3. La soluzione è intensamente opalescente. Il micoderma è grosso; l'odore è cattivo; la reazione è acida. Sul fondo vi è un leggero deposito granuloso. Anche qui il *Bacillus subtilis* è affatto scomparso e si trovano in quantità enorme le sue spore.

Soluzioni n. 4 e 5. Le soluzioni sono torbide, con micoderma grosso e rugoso. Il deposito è abbondante; l'odore è putrido, e la reazione è acida. Di bacilli non se ne trovano e sono copiosissime le spore.

Esame delle soluzioni mantenute a 37°.

20. Le soluzioni furono mantenute per nove giorni di seguito alla temperatura di 37° ed in questo periodo di tempo vennero esaminate quattro volte. Dalle osservazioni risultarono i fatti seguenti:

Dopo 1 giorno:

Le soluzioni sono tutte limpide e senza deposito. Nelle soluzioni n. 2, 3 e 4 si avverte una leggera pellicola; di più esse presentano un odore diverso alquanto dal normale, senza che si possa dire disgustoso, ed una reazione acida.

Soluzione n. 1. Si incontrano micrococchi, tanto liberi che allo stadio di diplococchi e di streptococchi. Abbastanza copioso è il *Bacillus subtilis* in catenelle ed in forme lunghe, incurvate. Vi è pure un bacillo virgolare ed un altro incurvato a semicerchio (rari).

Soluzione n. 2. Vi abbonda il *Bacillus subtilis* nelle varietà corta, media e lunga. Le forme lunghe sono spesso sporificate; alcune alle estremità, altre nell'interno. Souvi pochi cocchi liberi.

Soluzione n. 3. Trovasi copiosissimo il *Bacillus subtilis*, quasi esclusivamente nella forma corta, e qualche micrococco.

Soluzione n. 4. Si riscontra lo stesso reperto che nella soluzione n. 3.

Soluzione n. 5. Vi è quasi assenza di organismi; solo qualche bacillo corto e grosso.

Soluzione n. 6 e 7. Gli organismi mancano affatto, e vi si osserva solo delle grandi masse di materia granulosa, amorfa.

21. Dopo 3 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida e coperta alla superficie da uno straterello bianchiccio.

L'odore è d'iniziata putrefazione, e la reazione è acida. Il *Bacillus subtilis* è quasi completamente sporificato e le sue spore sono in numero straordinario.

Soluzione n. 2. S'incontrano le stesse cose della soluzione precedente n. 1.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbideccia ed acida. Vi è leggero deposito sul fondo, e galleggia sulla superficie una massa fioccosa, biancastra, che discende al fondo per leggera agitazione della soluzione. L'odore è putrido. La forma organica predominante è il *Bacillus subtilis* (varietà media) in lunghe catenelle di 20 e più individui. Le spore sono piuttosto rare.

Soluzione n. 4. La soluzione è torbida, acida, di odore nauseabondo. La superficie è coperta da uno straterello bianco, dal centro del quale si eleva una massa rugosa

e rossa. Si riscontra una grandissima quantità di bacilli (*Bacillus subtilis*) in tutte la varietà.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, senza pellicola. Ha l'odore normale di brodo concentrato e contiene pochissimi bacilli corti.

Soluzioni n. 6 e 7. Le soluzioni sono limpide, acide e senza micoderma. Hanno odore di brodo concentrato e non contengono alcun microorganismo.

22. Dopo 7 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida, acida, con un grosso strato bianco alla superficie, manda odore di putrefazione e contiene molte spore.

Soluzione n. 2. La soluzione è limpida, acida, con uno strato superficiale bianco, diviso in tante piccole porzioni circolari di 1 m.m. circa e formato da un denso intreccio di filamenti di *Leptothrix*. Il liquido manda odore putrido, e contiene numerosissimi bacilli (*Bacillus subtilis*) di tutte le grandezze.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbidecia, acida, con odore putrido e coperta da un denso micoderma, in cui abbonda il *Bacillus subtilis* in tutte le sue varietà e specialmente il *Leptothrix*.

Soluzione n. 4. La soluzione è torbida, acida e d'odore putrido. La massa rossa, rugosa, protendentesi sul micoderma, la quale venne descritta nel numero precedente (21, soluz. 4), si è come appassita e ricoperta di numerose goccioline di color giallo-canario, costituite dal *Micrococcus citreus*. Vi è copiosissimo il *Bacillus subtilis* sì isolato che riunito in lunghe catenelle di 20 a 30 articoli.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con distinto odore di brodo, e coperta da un velamento bianco, costituito dal *Bacillus subtilis* in tutte le sue varietà.

Soluzioni n. 6 e 7. Le soluzioni sono limpide, acide, d'odore intenso di brodo concentrato. Contengono molta materia granulosa, amorfa, ma nessun microorganismo.

23. Dopo 9 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione presenta lo stesso aspetto e le stesse forme organiche che al n. 22.

Soluzione n. 2. La soluzione è torbidecia, acida, con odore di putrefazione e coperta da uno strato grosso, rugoso, cosparso qua e là di masse gialle. Vi abbondano il *Bacillus subtilis* ed il *Micrococcus aurantiacus*.

Soluzione n. 3. La soluzione presenta lo stesso aspetto che al n. 22, con uno strato superficiale più ricco di masse gialle. Il *Bacillus subtilis* ed il *Micrococcus aurantiacus* vi è copiosissimo.

Soluzione n. 4. La soluzione non ha mutato dall'osservazione al n. 22, se non per la scomparsa delle goccioline gialle e del corrispondente *Micrococcus aurantiacus*. Ha invece raggiunto un notevole sviluppo il *Leptothrix* ed è molto più copioso il *Bacillus subtilis*.

Soluzione n. 5. Il velamento bianco, notato al n. 22, si è fatto più grosso, specialmente alla periferia. Il *Bacillus subtilis* vi si trova in quantità stragrande, con prevalenza della varietà media e lunga.

Soluzioni n. 6 e 7. Le soluzioni non hanno mutato i caratteri dell'osservazione precedente al n. 22.

Esame delle soluzioni mantenute a 50°.

24. Le soluzioni furono mantenute alla temperatura di 50° per sette giorni e furono osservate tre volte, cioè dopo il 1°, il 2° ed il 7° di. Due serie di esperienze, relative a questa temperatura, furono stabilite; l'una nel gennaio 1886 e l'altra nel gennaio 1887. Però essendo stati i risultati nell'uno e nell'altro caso molto analoghi, riferiremo quelli della seconda serie, includendovi le piccole differenze dai corrispondenti risultati della prima.

Dopo ventiquattro ore:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida, acida, senza odore e coperta da un velamento bianchiccio. Al microscopio si osservano lunghi filamenti, omogenei, segmentati, immobili. Questi segmenti si possono sorprendere nell'atto che abbandonano il filamento totale per assumere la forma di lunghi bacilli simili al *Bacillus subtilis* (varietà lunga). Vi sono anche bacilli più corti, isolati o riuniti in catenelle.

Soluzione n. 2. La soluzione è limpida, acida, senza odore e coperta da uno straterello bianco, discontinuo. Si nota grande quantità di piccoli bacilli, mobilissimi, isolati e riuniti in catenelle.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbida e contiene sospesi dei fiocchi di sostanza organica. È coperta da uno strato denso, rugoso e bianchissimo. Si osserva una quantità immensa di catenelle di bacilli sottili, uniformi (*Bacillus subtilis*).

Soluzione n. 4. La soluzione è torbideccia, acida, con odore di sostanza rancida. È coperta di uno strato sottile e discontinuo come la soluzione n. 2. Si notano pochi bacilli sottili, isolati e riuniti a due a due (*Bacillus subtilis*).

Soluzioni n. 5, 6 e 7. Le soluzioni sono limpide, acide, con forte odore di brodo concentrato. Non vi si riscontra alcun organismo.

25. Dopo due giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida, acida, con odore di acetone e coperta da uno straterello biancastro. Vi sono numerosissimi bacilli, appartenenti alla specie *Bacillus subtilis* (varietà media) e portanti una spora ad una ed anche ad entrambe le estremità. Molte spore sono anche isolate e sono così somiglianti a certe forme del *Bacterium termo* da non poterle differenziare se non colla colorazione.

Soluzione n. 2. La soluzione presenta le stesse cose della soluzione n. 1.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbideccia, acida, con odore aromatico (d'essenza di mandorle amare) e coperta alla superficie da un grosso strato bianco. Le forme organiche sono le stesse che nelle soluzioni n. 1 e 2, eccetto che v'è maggior numero di bacilli che di spore.

Soluzione n. 4. La soluzione è torbida, acida, con odore di sostanza putrefatta e coperta da una tenue pellicola. Le forme organiche sono le stesse che nella soluzione n. 3, con maggior copia però di bacilli e di spore.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con odore di brodo e senza pellicola. Vi è discreta quantità di bacilli piccoli, isolati e riuniti in catenelle. La sporificazione non è iniziata.

Soluzioni n. 6 e 7. Le soluzioni sono limpide, acide, con forte odore di brodo concentrato e senza pellicola. Non vi si osserva alcuna forma organica.

26. Dopo 7 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è torbideiccia, acida, con odore cattivo e coperta dallo straterello bianco. Vi è ancora abbastanza copioso il *Bacillus subtilis*, isolato ed unito alle sue spore.

Soluzione n. 2. La soluzione è torbida, acida, con odore cattivo e coperta dal micoderma. I bacilli sono quasi del tutto scomparsi, essendo invece abbondantissime le loro spore, molto somiglianti alla forma ordinaria del *Bacterium termo*.

Soluzione n. 3. La soluzione ha lo stesso aspetto della soluzione n. 2. I bacilli sono completamente scomparsi e persistono le spore in straordinaria quantità.

Soluzione n. 4. La soluzione presenta l'aspetto delle due precedenti, n. 1 e 2, tranne l'odore che tiene più della sostanza rancida che putrefatta, pure essendo sempre cattivo.

Vi si notano bacilli isolati lunghi, flessuosi e catenelle di bacilli, nonchè numerose spore; tutto appartenente alla specie *Bacillus subtilis*. Il *Proteus vulgaris* è pure presente. Vi sono poi molti cristalli tavolari e prismatici che ci parvero di inosite e creatina.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con distinto odore di brodo e senza micoderma. Non vi è alcuna forma organizzata, ed abbondano i cristalli sopracitati.

Soluzioni n. 6 e 7. Le soluzioni presentano le stesse cose che al n. 25, coll'aggiunta degli accennati cristalli, osservati nelle soluzioni n. 4 e 5.

Esame delle soluzioni mantenute a 60°.

27. Le soluzioni furono mantenute per due giorni a 60°, ed, esaminate di poi, presentavano le cose seguenti:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida, con odore normale di brodo Liebig molto diluito, senza deposito, senza traccia di micoderma. Trovasi sviluppato in discreta quantità il *Bacillus subtilis*, in forme corte, omogenee, mobili, isolate e riunite a due a due od in catenella. Sonvi pure le forme medie e lunghe, per lo più isolate e sporificate ad una od anche ad ambe le estremità del bacillo.

Soluzione n. 2. La soluzione è leggermente opalescente, ma senza pellicola superficiale. L'odore è quello normale di brodo e la reazione è acida. Vi sono le stesse forme organizzate della soluzione n. 1, ma in quantità maggiore.

Soluzione n. 3. La soluzione, come nell'osservazione al n. 26, è ancora leggermente opalescente, con lo stesso odore e senza micoderma. Presenta le stesse forme organiche che nelle soluzioni n. 1 e 2 prevalendo però gl'individui piccoli. La sporificazione altresì è meno avanzata.

Soluzione n. 4. La soluzione è distintamente opalescente, acida, con odore di putrefazione. Al microscopio si notano le stesse cose che nella soluzione n. 3, essendo però molto più numerosi i bacilli.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, senza pellicola con odore spiccato di brodo. Si avvertono delle goccioline adipose ma nessuna forma organizzata.

Esame delle soluzioni mantenute alla temperatura di 67°.

28. Le soluzioni furono mantenute a 67° per undici giorni e furono esaminate tre volte. Le cose osservate sono:

Dopo 3 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è distintamente opalescente, acida, con pellicola superficiale iridescente e leggero deposito sul fondo. Il *Bacillus subtilis* vi è abbondante nella forma media e lunga. La sporificazione è copiosa, e sono frequenti i lunghi e flessuosi bacilli, pieni di spore nel loro interno.

Soluzione n. 2. La soluzione è leggermente opalina, acida, con numerosissimi piccoli grumi biancastri sospesi. Ha un micoderma sottilissimo, iridescente ed un deposito più abbondante che non nella soluzione n. 1. L'odore s'accosta a quello di sostanza rancida. Le forme bacillari sono le stesse che nella soluzione n. 1; però sono più numerosi i bacilli lunghi ripieni di spore, e più avanzata in genere la sporificazione. Trovansi anche catenelle di cocchi (*streptococchi*) e molte spore isolate.

Soluzione n. 3. La soluzione presenta lo stesso aspetto e le stesse forme organiche che la precedente; sono però più copiosi i bacilli e meno le spore.

Soluzione n. 4. La soluzione non ha alcun carattere diverso dalla precedente, n. 3, se non l'odore più accentuato di sostanza rancida, una maggior abbondanza di bacilli piccoli e la sporificazione appena iniziata.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, senza micoderma, con distinto odore di brodo. Essa non contiene microorganismi; ma grande copia di cristalli talvolari e stellariformi di creatina e di inosite (?).

29. Dopo 6 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione n. 1 è limpida, senza pellicola, con odore normale. I bacilli sono molto rari, mentre sono abbondanti le spore.

Soluzione n. 2. La soluzione è opalescente, acida, con odore poco alterato rispetto al normale e con micoderma discretamente grosso, discontinuo. Si notano pochissimi bacilli (*Bacillus subtilis*) della varietà media, isolati ed in catenelle, e spore in grande quantità. Sonvi pure cristalli di inosite e di creatina.

Soluzione n. 3. La soluzione è opalescente, acida, con spiccato odore di sostanza rancida e con pellicola continua e più grossa che nella soluzione n. 2. Vi è un'immensa quantità di bacilli (*Bacillus subtilis*) nella varietà piccola e media, mentre la sporificazione non è molto progredita. Qui pure sonovi cristalli di inosite e di creatina.

Soluzione n. 4. La soluzione è limpida, acida, con odore di sostanza rancida e tiene in sospensione dei grumi che si staccano dal grosso micoderma superficiale. Le forme organiche sono le stesse che nella soluzione n. 3.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con odore di brodo. Anche in essa si è formata la pellicola, ma è costituita da cristalli di creatina e di inosite (?) e non si avverte alcun microorganismo.

30. Dopo 11 giorni:

Nelle soluzioni si osserva una quasi totale scomparsa delle forme bacillari e delle loro spore, senza che vi si sostituisca alcun altro schizomiceto; mentre si nota una considerevole abbondanza dei cristalli sopraccennati.

Esame delle soluzioni mantenute a 79°.

31. Le soluzioni vennero mantenute alla temperatura di 79° per 3 giorni e furono osservate due volte.

L'esame diede i risultati qui appresso:

Dopo 1 giorno:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpidissima, acida, con odore normale e nessuna pellicola. Contiene qualche granulazione vibrante (moto browniano), ma nessuna forma distintamente organizzata.

Soluzione n. 2. La soluzione presenta le stesse cose della precedente n. 1.

Soluzione n. 3. La soluzione presenta l'aspetto delle precedenti n. 1 e n. 2. Contiene però lunghi filamenti rettilinei, omogenei, divisi in frammenti della lunghezza delle maggiori forme di *Bacillus subtilis*.

Soluzione n. 4. La soluzione presenta gli stessi caratteri della precedente n. 3.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con forte odore di brodo e con pellicola superficiale, costituita da ammassi di granulazioni amorfe, delle quali alcune sono regolari, rotonde ed ovali e sono in preda a vivace moto browniano, nonchè ad un lento moto di traslazione in varie direzioni. Questi ammassi di granulazioni si tingono perfettamente coll'anilina. Si osservano ancora piccoli cristalli prismatici in grande copia, isolati e riuniti in gran numero, cui abbiamo riferito alla creatina.

32. Dopo 3 giorni:

Le soluzioni non hanno mutato, sia per quanto rifletta l'aspetto fisico che per quanto concerne i reperti microscopici.

Esame delle soluzioni mantenute a 100°.

33. Le soluzioni furono mantenute alla temperatura di 100° per sette giorni, e vennero esaminate dopo il 2°, il 4° ed il 7° dì. Ma nessuna modificazione intervenne per tale riscaldamento in alcuna delle solite cinque soluzioni, salva la comparsa di alcuni cristalli, simili a quelli più sopra accennati.

Esame delle soluzioni mantenute a 79° ed a 100° dopo lo sviluppo a 37°.

34. Le soluzioni furono mantenute per quattro giorni alla temperatura di 37° e, poichè furono popolatissime di microorganismi (veggasi a n. 20), vennero portate a 79° e quindi a 100°, e mantenute per due giorni a ciascuna delle due temperature. Furono esaminate poi due volte, dopo il 2° e 4° giorno, e presentarono i seguenti caratteri:

Dopo due giorni, ossia dopo il riscaldamento a 79°:

Soluzione n. 1. La soluzione è leggermente opalescente, acida, con odore di sostanza rancida, con tracce di micoderma e con deposito bianchiccio. Vi si trova in discreta quantità la forma corta del *Bacillus subtilis*, in preda a lento movimento di traslazione.

Soluzione n. 2. La soluzione ha lo stesso aspetto della precedente, n. 1, galleggia sulla superficie un grumetto bianco, costituito dal *Bacillus subtilis*, in tutte le lunghezze ed in preda a moti vivaci. La stessa specie è diffusa nella soluzione. La sporificazione dei bacilli è avanzata e trovasi altresì uno stafilococco in discreta quantità.

Soluzione n. 3. La soluzione presenta lo stesso aspetto delle precedenti n. 1 e 2. Il *Bacillus subtilis*, non molto copioso, è rappresentato dalla sola forma corta ed è molto vivace nei movimenti. È assai abbondante lo stafilococco, ed i cocci, molto piccoli, sono anche isolati e riuniti in diplococchi e streptococchi.

Soluzione n. 4. La soluzione presenta le stesse cose della soluzione precedente n. 3.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, senza micoderma e con forte odore di brodo. Non vi si trovano microorganismi.

35. Dopo 4 giorni, ossia dopo il riscaldamento per 2 giorni a 100°.

Le soluzioni tutte non hanno mutato il loro aspetto fisico dell'osservazione precedente.

Nelle soluzioni n. 1, 2, 3 e 4 si riscontrano gli stessi microorganismi dell'osservazione precedente (n. 34). I micrococchi sono immobili, e così pure alcuni bacilli che presentano un contenuto granuloso, discontinuo. Però molti bacilli, tuttora sporificati, ed altri non sporificati, conservano un movimento distinto, abbastanza vivace, e coltivati sull'agar ed in gelatina si moltiplicano rapidamente (1).

Nella soluzione n. 5 non si osserva alcun microorganismo.

Esame delle soluzioni scaldate a 115° e 130° e mantenute di poi a 40°.

36. Le soluzioni N. 1, 3 e 5 vennero chiuse a fuoco, dopo essere state fatte bollire, nei tubi capillari ed in palloncini sterilizzati della capacità di circa 100cc., della quale esse occupavano circa 20cc. Furono mantenute per due ore e mezzo alla temperatura di 115° e di poi tenute per 5 giorni alla temperatura di 40°. Esaminate di poi presentarono i seguenti caratteri:

Le soluzioni sono perfettamente limpide, acide e con odore di brodo, più o meno concentrato. Si notano in gran copia dei filamenti lunghi, intrecciantisi, omogenei. V'hanno pure molte granulazioni vibranti di varia forma. Parecchie di esse sono ovalari, simili a piccoli bacteri, dotate di moto di traslazione in varie direzioni e colorantisi perfettamente coll'anilina. Furono poi fatte parecchie colture coi liquidi di questi palloncini sull'agar-agar ed in gelatina, e si ottenne lo sviluppo di una colonia di microorganismi (cocchi) dalla coltura della soluzione n. 3.

37. Le soluzioni furono mantenute a 130° per circa 3 ore e quindi tenute per cinque giorni a 40°.

Due serie speciali poi delle cinque soluzioni furono contemporaneamente mantenute a 130 per due ore e mezzo nella pentola di Papin e di poi tenute a 40° per 5 dì. Di una serie però le soluzioni erano, al solito, suggellate alla fiamma entro le rispettive provette, dell'altra serie invece le soluzioni erano semplicemente coperte con un tappo di cotone purissimo.

L'esame in ogni caso diede i seguenti risultati:

Le soluzioni sono limpide, acide, con odore normale di brodo. Solo la soluzione n. 1 (suggellata a fuoco) delle due serie speciali presentò un leggero deposito biancastro sulla parete della provetta, il quale dava al liquido un'apparenza opalina.

Quanto alle forme organizzate il reperto fu molto simile a quello dell'osservazione precedente (n. 36). Soltanto sono un po' più scarsi e lunghi i filamenti intrecciati, nonché le regolari granulazioni ovoidi, rassomiglianti a piccoli bacteri. Furono

(1) Uno studio recentissimo di Miquel (*Monographie d'un bacille vivant au dela de 70° C.*), pubblicato negli *Annales de Micrographie*, 1^{re} année, n. 1, 15 octobre 1888, dimostra quello, che già noi avevamo provato; cioè, come possano vivere e svilupparsi alcune specie di bacteri, anche a temperature molto superiori a quelle comunemente ritenute quali limiti massimi per la vita e lo sviluppo dei bacteri.

eseguite di poi le coltivazioni dei liquidi di ciascuna soluzione sull'agar-agar ed in gelatina, ma non ebbero sviluppo d'alcuna colonia.

c) Soluzioni di gelatina.

Esame delle soluzioni mantenute a temperature inferiori a 25°.

38. Le soluzioni furono preparate con gelatina purissima, fornitaci dalla Casa Leonardi e Zambelli di Torino, e vennero tenute ad una temperatura sempre inferiore a 25°, alla quale esse si rapprendono e si mantengono inalterate anche per mesi. Un'ultima osservazione, fatta il 15 maggio 1887 sulle soluzioni n. 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 preparate lo scorso novembre 1886 e mantenute a lungo in ambienti relativamente caldi (18°-20°), diede un risultato completamente negativo, cioè non si osservò lo sviluppo di alcun microorganismo.

Esame delle soluzioni mantenute a 26°.

39. Le soluzioni furono mantenute per un mese alla temperatura di 26° e furono osservate parecchie volte. I fatti notati furono questi:

Dopo 2, 4, 8 e 12 giorni nelle soluzioni non si avvertì alcun sviluppo di forme organizzate, e le soluzioni stesse si erano conservate limpide, omogenee, semifluide, neutre e senza odore.

40. Dopo un mese le soluzioni n. 1 e 2 si presentano ancora inalterate, senza alcun microorganismo; mentre le altre, n. 3, 4 e 5, sono completamente fluide, alquanto torbide, acide e con odore sgradevole. Il microscopio rivela un grande sviluppo del *Bacillus subtilis*, sporificato, nella varietà media e lunga. Il bacillo è sensibilmente più sottile che non nelle soluzioni di estratto di carne.

Esame delle soluzioni mantenute a 37°.

41. Le soluzioni furono mantenute alla temperatura di 37° per otto giorni e furono esaminate 4 volte. I diversi reperti sono stati questi.

Dopo due giorni:

Soluzioni n. 1 e 2. Le soluzioni sono limpide, neutre, senza odore, con una sottilissima pellicola alla superficie. Si nota un considerevole sviluppo di forme bacillari corte e sottilissime, cui non sapremmo riferire che alla varietà corta del *Bacillus subtilis*.

Soluzioni n. 3 e 4. Le soluzioni sono leggermente opaline, acide, con odore di sostanza rancida e con una sottile pellicola alla superficie. Sono sospesi nelle soluzioni alcuni fiocchetti bianchi, di forma sferica raggiate. Trovansi molti bacilli, identici a quelli delle soluzioni precedenti n. 1 e 2. I fiocchi sono costituiti dal comune *Penicillium glaucum* in via di sviluppo.

Soluzione n. 5. La soluzione è opalescente, acida, senza odore, senza micoderma e sparsa di fiocchetti più numerosi. Vi abbonda il *Penicillium* suddetto e manca ogni specie di schizomiceti.

42. Dopo 4 giorni:

Soluzioni n. 1, 2, 3 e 4. Le soluzioni non presentano alcuna differenza delle osservazioni precedenti al n. 41.

Soluzione n. 5. La soluzione contiene un bacillo sottile e corto, nonchè il *Bacterium lincola* Cohn.

43. Dopo 6 giorni:

Soluzioni n. 1 e 2. Le soluzioni sono limpide, acide, senza micoderma e con odore di sostanza rancida. Havvi qualche fiocco di *Penicillium* e discreta quantità di bacilli sottilissimi, lunghi ed articolati, che riferirò al *Bacillus subtilis*, notando però la maggiore sottigliezza in generale di questa specie, osservata nelle soluzioni di gelatina, a differenza di quella osservata nelle soluzioni di estratto di carne.

Soluzioni n. 3 e 4. Le soluzioni sono limpide, acide, senza pellicola e con odore indistinto. Trovasi copioso il *Penicillium glaucum*; sono pochi invece i bacilli corti e sottili, ed avvi qualche grappolo di micrococchi (stafilococchi).

Soluzione n. 5. La soluzione è abbastanza limpida, acida, d'odore sgradevole, con un grosso strato bianco alla superficie, in qualche punto verdognolo. La soluzione contiene verso la metà della sua altezza una massa jalina con punti alquanto oscuri, simili al corpo di taluni celenterati. Lo strato superficiale è costituito da un fitto intreccio di *miceli* con spore (*Penicillium*). I bacilli sono abbastanza copiosi. La massa jalina è formata esclusivamente di gelatina.

44. Dopo 8 giorni:

Le soluzioni presentano poca differenza dall'osservazione precedente al n. 43. Si nota solo la prevalenza dei bacilli nelle soluzioni diluite, n. 1 e 2, e la prevalenza invece del *Penicillium* nelle soluzioni concentrate, n. 4 e 5.

Esame delle soluzioni mantenute a 50°.

45. Le soluzioni furono mantenute per nove giorni alla temperatura di 50° e furono esaminate 4 volte. I reperti sono questi:

Soluzioni n. 1, 2, 3, 4 e 5. Le soluzioni sono limpide, neutre, senza micoderma; soltanto la soluzione n. 5 presenta una distinta opalescenza dovuta non a scomposizione della sostanza organica, ma alla notevole densità della soluzione. Al microscopio non si riscontrano nè cocchi, nè batteri, nè bacilli; trovasi invece il *Penicillium* nelle soluzioni n. 4 e 5, insieme con certe sfere, a doppio contorno, della grandezza apparente di una lenticchia (1200 diam.), che hanno un contenuto granuloso e sono molto mobili.

46. Dopo tre giorni:

Le soluzioni presentano le stesse cose che nell'osservazione precedente al n. 45. Solo notasi la diminuzione del *Penicillium* e l'aumento considerevole delle sfere granulose nelle soluzioni n. 4 e 5. Alcune di queste sfere sono rotte, e si vede uscir dal loro interno delle granulazioni sferiche, jaline, vibranti, colorantisi coll'anilina. Le abbiamo ascritte alle microsporine di Klebs.

47. Dopo 5 giorni:

Le microsporine sono abbondanti nella soluzione n. 5, che è ancora alquanto opalescente; sono invece scarse nelle soluzioni n. 4. Nella soluzione n. 3 trovasi in grande copia il *Penicillium* e nell'altre due non si osserva alcuna forma organizzata.

48. Dopo 9 giorni:

Da tutte le soluzioni è scomparsa affatto ogni forma organizzata.

d) Soluzioni di peptone.

Esame delle soluzioni mantenute a 16°.

49. Le soluzioni preparate con peptone puro, fornitoci dalla Casa Leonardi e Zambelli di Torino, furono mantenute per 14 giorni alla temperatura di 16° e quindi esaminate.

Soluzioni n. 1, 2 e 3. Le soluzioni sono limpide, acide, senza pellicola superficiale e senza deposito, con odore normale di peptone. Al microscopio si notano molte granulazioni rotonde, piccolissime, appena visibili coll'ingrandimento di 1200 diam., vibranti e colorantisi coll'anilina. Una coltura sull'agar, tenuta più giorni a 37°, rimase senza sviluppo.

Soluzioni n. 4 e 5. Le soluzioni tengono in sospensione qualche grumo; sono coperte alla superficie da uno straterello biancastro, discontinuo; sono acide, con odore spiccato di peptone. Al microscopio si notano le stesse granulazioni minutissime, rotonde, vibranti, che notammo nelle soluzioni n. 1, 2 e 3.

Esame delle soluzioni mantenute a 37°.

50. Le soluzioni furono mantenute per sei giorni alla temperatura di 37° e vennero osservate tre volte.

I reperti furono questi:

Dopo 1 giorno:

Soluzioni n. 1, 2, 3, 4 e 5. Le soluzioni sono limpide, acide, d'odore caratteristico di peptone e di un colore verdognolo, che cresce gradatamente d'intensità dalla soluzione n. 1 alla soluzione n. 5. L'esame al microscopio non rivela alcuna forma organizzata.

51. Dopo 3 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione è limpida, senza pellicola, senza odore. Sul fondo vi è un fiocco biancastro, formato da un *Penicillium*. Nessun altro microorganismo vi si avverte.

Soluzione n. 2. La soluzione è limpida, acida, con debolissimo odore di peptone. È coperta alla superficie da una pellicola discontinua, fragile, che ad una leggera agitazione si rompe e si diffonde in minutissimi frammenti nel liquido. Sul fondo v'ha un fiocco biancastro, costituito dal comune *Penicillium glaucum*. Trovasi abbondantissimo il *Bacterium termo*, in diverse forme, dalle quali potemmo isolarne una colle colture che riferimmo al *Bacillus fluorescens liquefaciens*.

Soluzione n. 3. La soluzione presenta lo stesso aspetto della precedente n. 2, tranne che manca lo strato superficiale. Esistono due fiocchi di *Penicillium glaucum* e pochi batteri (*Bacterium termo*).

Soluzione n. 4. La soluzione offre lo stesso aspetto delle precedenti n. 2 e 3. Sonvi copiosi i fiocchi di *Penicillium glaucum*, ma manca affatto il *Bacterium termo*.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con distinto odore di peptone e coperta da un grosso strato rugoso, verde, costituito dal *Penicillium glaucum*.

52. Dopo 4 giorni:

Soluzione n. 1. La soluzione tiene sospeso un fiocco semitrasparente, che nuota verso il mezzo della massa liquida. Ha un odore di incipiente putrefazione; non ha pellicola superficiale, ma un deposito fiaccoso, bianco-giallognolo sul fondo. Al microscopio si nota un'immensa quantità di piccoli e sottili bacilli (*Bacillus subtilis*), isolati e riuniti in catenelle, mobili e sporificati. Il fiocco è formato dal *Penicillium glaucum*.

Soluzione n. 2. La soluzione è torbida, acida, d'odore disgustoso, con deposito granuloso e strato bianco-grigiastro, discontinuo alla superficie. Si nota un grande sviluppo del *Bacterium termo*, in forme varie.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbida, acida, d'odore cattivo, con uno strato superficiale verdastro, continuo, costituito dal *Penicillium glaucum*. Mancano gli schizomiceti.

Soluzioni n. 4 e 5. Le soluzioni hanno lo stesso aspetto della precedente n. 3, tranne l'odore ch'è quello normale di peptone. Lo strato superficiale verde è costituito dal *Penicillium glaucum*.

Esame delle soluzioni mantenute a 50°.

53. Le soluzioni vennero mantenute alla temperatura di 50° per sette giorni e furono esaminate tre volte. I fatti raccolti sono i seguenti:

Dopo un giorno:

Soluzioni n. 1, 2, 3, 4 e 5. Sono limpide, di colore verdognolo, vieppiù spiccate nelle soluzioni vieppiù dense. Esse non hanno strato superficiale, solo le soluzioni n. 4 e 5 presentano alla superficie una specie di schiuma biancastra e sul fondo un deposito gelatinoso, bianco-giallognolo. Al microscopio non riscontrasi alcuna forma organizzata.

54. Dopo 4 giorni:

Soluzioni n. 1, 2 e 3. Le soluzioni sono limpide, acide, d'odore normale, senza pellicola superficiale, con un piccolo deposito bianco-giallognolo, soffice sul fondo e con alcuni fiocchi bianchi, albuminosi, galleggianti; non trovasi alcuna forma organizzata.

Soluzioni n. 4 e 5. Le soluzioni sono limpide, acide, con distinto odore di peptone, e presentano qualche micelio di *Penicillium glaucum*, ma nessun schizomiceto.

55. Dopo 7 giorni:

Soluzioni n. 1, 2, 3, 4 e 5. Le soluzioni sono perfettamente limpide, acide, con deposito bianco-giallognolo e con odore normale di peptone. Non contengono alcun microorganismo, ed anche il *Penicillium* è scomparso.

e) Soluzioni di tuorlo d'uovo.

Esame delle soluzioni mantenute a 60°.

56. Veramente questi miscugli di tuorlo d'uovo coll'acqua distillata non meritano il nome di soluzioni, essendo il tuorlo soltanto stemperato nell'acqua, dachè vi è poco solubile. Essi sono semplici emulsioni, e per ciò, dopo una prima serie di osservazioni, abbiamo abbandonata questa sostanza, come affatto disadatta. Le emulsioni

furono mantenute alla temperatura di 60° per due giorni e vennero di poi esaminate. Il reperto fu questo.

Emulsioni n. 1 e 2. Le emulsioni sono di color bianco-lattiginoso, senza odore, senza pellicola, con piccolo deposito. Si osservano al microscopio granuli sferici vibranti ed un intreccio di lunghi fili, che ricordano il *Leptothrix*.

Emulsioni n. 3 e 4. Le emulsioni son lattiginose, d'odore disgustoso, con una sottile pellicola bianca alla superficie ed un discreto deposito sul fondo. Si notano al microscopio i granuli succitati vibranti, delle goccioline adipose ed il *Bacterium termo* in discreta quantità ed in forme varie.

Emulsione n. 5. L'emulsione è limpida, senza odore, senza micoderma, con abbondantissimo deposito. Non vi si trovano i granuli vibranti ed i batteri; sono invece abbondantissime le goccioline adipose, che variano dalla grandezza dei micrococchi a quella di un'ordinaria lenticchia (1200 diam.).

f) Soluzioni di estratto di carne, di gelatina e di peptone.

Esame delle soluzioni mantenute a temperature inferiori a 0° e dapprima seminate.

57. Le differenti serie di soluzioni d'estratto di carne, di gelatina, di peptone furono mantenute per durate di tempo diverse, variabili da poche ore a parecchie giornate, alle temperature di — 2°, — 10°, — 15°, — 21° e — 60°, essendo state prima direttamente seminate con una goccia di liquido ricco di batteri (*Bacterium termo*), di bacilli (*Bacillus subtilis*), ed anche con qualche fiocco di *Penicillium*. I microorganismi seminati non perirono; perchè, anche dopo 24 ore di raffreddamento a — 21° e quattro ore a — 60°, le soluzioni, portate a — 37°, in breve tempo si popolarono dei microorganismi seminati.

D. Ricerche sull'influenza delle azioni elettriche e magnetiche.

a) Influenza di una semplice differenza di potenziale elettrico.

58. Una soluzione di estratto Liebig, corrispondente al n. 3, fu posta in un tubo di vetro incurvato ad U (fig. 3) e nell'uno e nell'altro dei due rami fu impegnata, mediante tappi di sughero, una lamina di platino, la quale pescava nella soluzione fin quasi al fondo del tubo. L'una e l'altra lamina venne poi messa in comunicazione, mediante opportuni reofori, coi poli di una pila, costituita da 120 elementi di zinco ed argento in acqua distillata. La pila presentava ai poli una differenza di potenziale elettrico di circa 140 Volts e non dava che una corrente da 0,3 a 0,4 milliampère.

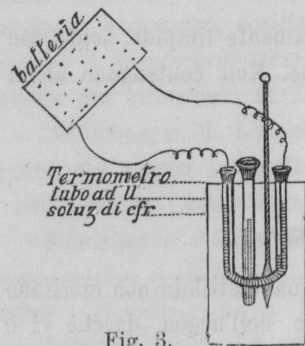


Fig. 3.

reperto fu questo:

La soluzione fu lasciata per sei giorni sotto questa tensione elettrica, mantenendo nel frattempo la temperatura fra 15° a 16°, e venne quindi esaminata. Il re-

Nel ramo del tubo in cui pesca il polo negativo della pila la soluzione è torbida fino ad un centimetro circa sotto la superficie, la quale è coperta da uno straterello biancastro, omogeneo. La soluzione è neutra e non ha alcun odore. Al microscopio si osserva una considerevole quantità di piccoli e sottili bacilli, in parte isolati e mobilissimi, in parte riuniti in catenelle (*Bacillus subtilis*). Anche il *Bacterium termo* è abbastanza copioso.

Nel ramo del tubo in cui pesca il polo positivo della pila la soluzione non è torbida e non ha pellicola superficiale. In essa si incontrano rare catenelle, lunghe e flessuose, di bacilli appartenenti alla varietà media e lunga del *Bacillus subtilis*.

Nella soluzione di confronto, posta in una provetta allato del tubo ad U e identica a quella contenuta nel medesimo tubo, lo sviluppo del *Bacillus subtilis* in tutte le lunghezze e del *Bacterium termo* è straordinariamente grande.

b) Influenza della corrente elettrica.

59. In due tubi ad U, eguali al sopradescritto (fig. 4), furono posti 25 cc. della soluzione n. 3 di estratto di Liebig. Attraverso l'uno di essi si mandò una corrente data da due elementi Bunsen, di cui la forza elettromotrice era di 3,75 Volts e l'intensità di 2,36 Ampère, ed attraverso l'altra una corrente fornita da quattro elementi Bunsen, di cui la forza elettromotrice era di 7,25 Volts e l'intensità di 3,98 Ampère. Allato ai tubi fu posta una provetta contenente la stessa soluzione n. 3, perchè servisse di confronto, ed i tubi e la provetta furono mantenuti alla temperatura di 37° per 48 ore.

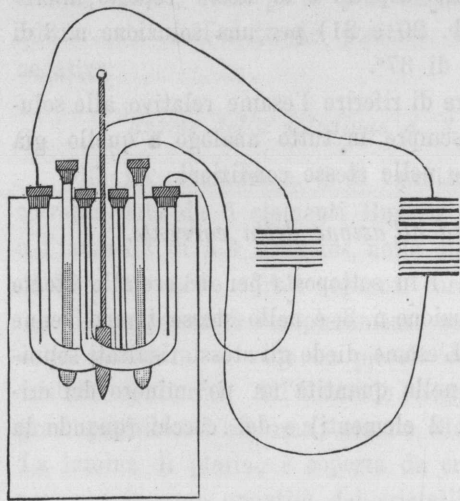


Fig. 4.

La forza elettromotrice e l'intensità di corrente della batteria fu misurata prima e dopo l'esperienza, ed i numeri surriferiti rappresentano i valori medi delle due letture, sebbene abbiano sempre variato di poco le costanti della pila dall'un caso all'altro.

Esame della soluzione sottoposta alla corrente di due elementi.

60. Nel ramo in cui pesca il polo negativo la soluzione è coperta da un sottilissimo strato superficiale iridescente. La reazione è alcalina, l'odore forte, ammoniacale. L'ammoniaca si svela introducendo nel ramo del tubo un bastoncino di vetro bagnato nell'acido cloridrico. Sulla lamina di platino (elettrodo negativo) è deposto uno straterello biancastro, granuloso. Al microscopio si osserva che tanto la pellicola superficiale, quanto lo strato deposto sulla laminetta sono costituiti da cristalli, o tavolari, o prismatici, o stellariformi che riferimmo alla inosite e cretina. V'è qualche catenella di bacilli di media lunghezza (*Bacillus subtilis*).

Nel ramo in cui pesca l'elettrodo positivo la soluzione è acida, con odore gradevole, etereo. Non havvi pellicola superficiale, nè deposito sulla lamina di platino. Avvertesi solo qualche bolla gasosa alla superficie. L'esame microscopico dimostra l'assenza completa, tanto dei cristalli, che dei microorganismi.

Esame della soluzione sottoposta alla corrente di quattro elementi.

61. Nel ramo in cui pesca l'elettrodo negativo la soluzione presenta le stesse condizioni descritte nell'esame precedente (n. 60), salvo che la pellicola superficiale ed il deposito sulla lamina di platino sono più accentuati. Il microscopio dimostra la presenza dei cristalli sopradescritti e di altri simili a quelli del nitrato di urea, e la presenza di un gran numero di granulazioni sferiche, omogenee, eguali fra loro, vibranti e colorantisi colle aniline. Si direbbero micrococchi, ma coltivati in gelatina, sull'agar e sulle patate non si sviluppano. Però seminati in una soluzione acquosa d'urea purissima, ne determinarono la decomposizione con sviluppo sensibile di ammoniaca. Intorno alla natura di queste granulazioni siamo rimasti tuttavia molto incerti.

Al polo positivo la soluzione è limpida, acida, d'odore gradevole (etereo), senza strato superficiale e senza deposito sulla lamina di platino. Al microscopio non si avvertono nè cristalli, nè forme organizzate.

La soluzione di confronto presenta lo stesso aspetto e lo stesso reperto microscopico, che furono descritti più addietro (C. b. 20 e 21) per una soluzione n. 3 di estratto di carne, mantenuta alla temperatura di 37°.

Anzi, d'ora in poi, tralasceremo addirittura di riferire l'esame relativo alle soluzioni di confronto, poichè esso si presentò sempre in tutto analogo a quello già descritto per le corrispondenti soluzioni, tenute nelle stesse condizioni.

Esame della soluzione n. 1 sottoposta all'azione della corrente.

62. La soluzione di estratto di Liebig n. 1 fu sottoposta per 48 ore alle stesse correnti, cui fu assoggettata la precedente soluzione n. 3, e nello stesso tempo venne mantenuta alla medesima temperatura di 37°. L'esame diede gli stessi risultati sopradescritti ai n. 60 e 61; la sola differenza fu nella quantità un po' minore dei cristalli, dei bacilli (quando la corrente era di 2 elementi) e dei cocchi (quando la corrente era di 4 elementi).

Esame della soluzione n. 4 sottoposta all'azione della corrente.

63. Due soluzioni di estratto Liebig n. 4 furono assoggettate per 48 ore, l'una all'azione della corrente data da due elementi Bunsen, di cui la forza elettromotrice era di 2,9 Volts e l'intensità di 2,07 Ampère, e l'altra all'azione della corrente fornita da 4 elementi Bunsen, di cui la forza elettromotrice era di 5,8 Volts e la intensità di 3,08 Ampère, mentre erano entrambi mantenute alla temperatura di 37°. L'esame diede il risultato seguente:

Soluzione influenzata dalla corrente di 2 elementi.

La soluzione all'elettrodo negativo ha la superficie coperta da un grosso micoderma, su cui sta uno strato di schiuma, che si arrampica anche sulle pareti. Il liquido è limpido, debolmente alcalino, con odore di sostanza rancida, ma non ammoniacale.

Sulla lamina di platino non vi è deposito. Al microscopio si osserva un grande sviluppo del *Bacillus subtilis* nella sua varietà più corta. I bacilli sono riuniti in catenelle lunghe e tortuose, le quali sono a ridosso l'una dall'altra sì da costituire delle vere fettucce di bacilli. I cristalli sono rari.

All'elettrodo positivo non si osserva alcuna alterazione, all'infuori di un odore leggermente eterico. Al microscopio non si avvertono nè microorganismi, nè cristalli.

Soluzione influenzata dalla corrente di quattro elementi.

64. All'elettrodo negativo si nota un abbondantissimo sviluppo di gas, che formano sulla superficie uno strato di schiuma, denso ed alto 2 centimetri. Non ha pellicola; si avverte un forte odore di ammoniaca, svelata anche dalla formazione di cloruro d'ammonio coll'avvicinare una bacchetta di vetro bagnata nell'acido cloridrico. Esiste un distinto deposito granuloso e bianco sulla lamina di platino. Al microscopio si osserva una grande quantità di cristalli di inosite, creatina, e nitrato d'urea, nonché delle granulazioni sferiche, omogenee, a guisa di quelle più sopra descritte, intorno alla natura delle quali restammo pure questa volta del tutto incerti.

All'elettrodo positivo la soluzione si presenta limpida, perfettamente scolorita, d'odore eterico e con uno straterello di schiuma alla superficie. Uno straterello circolare nerognolo, nella parte più bassa del tubo ad U, divide la soluzione scolorita, attraversata dall'elettrodo positivo, dall'altra rossastra, attraversata dall'elettrodo negativo.

Esame della soluzione n. 3 sottoposta all'azione della corrente.

65. La soluzione n. 3 di estratto di carne venne sottoposta per 48 ore ad una corrente data da 6 elementi Bunsen, di cui la forza elettromotrice era di 12,5 Volts e l'intensità di 5,3 Ampères, nello stesso tempo che era mantenuta alla temperatura di 37°. All'esame offrì i seguenti caratteri:

La soluzione è completamente scolorita e sul fondo del tubo, in corrispondenza della curvatura, si vede un piccolo deposito, bianco-niveo, costituito da minutissimi cristalli aghiformi. All'elettrodo negativo la soluzione è coperta alla superficie da gran quantità di schiuma; manda odore forte ammoniacale ed ha reazione alcalina. La lamina di platino è coperta da cristalli aghiformi. Al microscopio si nota la sola presenza in gran quantità dei cristalli suaccennati, i quali costituiscono anche il deposito di fondo; ma non si riscontra alcuna forma sicuramente organizzata.

All'elettrodo positivo la schiuma è in quantità molto minore. La soluzione è acida, d'odore eterico, e la lamina di platino è pulitissima. Non si osservano nè cristalli, nè microorganismi.

Esame della soluzione di gelatina sottoposta all'azione della corrente.

66. Una soluzione di gelatina purissima, corrispondente al n. 3, fu sottoposta all'azione di una corrente data da quattro elementi Daniell di cui la forza elettromotrica era di 4,22 Volts e l'intensità di corrente di 0,29 Ampères, ed in paritempo era mantenuta alla temperatura di 37°. L'azione della corrente fu continuata per 4 giorni e si stabilirono due esami. Sono questi i reperti:

Dopo un giorno:

La soluzione presenta una nubecola di gelatina verso la parte incurvata del tubo. Alla superficie in corrispondenza del polo negativo, vi è una sottilissima pellicola formata da cristalli tavolari, grandi ed iridescenti. L'odore è indefinibile e la reazione è neutra. Non s'incontrano microorganismi.

All'elettrodo positivo non havvi pellicola, non si sviluppa alcun odore, nè vi sono microorganismi.

67. Dopo 4 giorni:

Si riscontrano le stesse cose tanto al polo positivo che al polo negativo, dove però la pellicola superficiale s'è fatta più grossa. Non vi è alcuno sviluppo di forme organizzate.

c) Influenza della corrente elettrica indotta.

68. Furono sottoposte le diverse serie di soluzioni organiche (estratto Liebig, gelatina, peptone, tuorlo d'uovo), per una durata di tempo da un giorno a tre, all'azione di fortissime correnti indotte, date dal *grande rocchetto Ruhmkorff ad interruttore di Foucault* dell'Istituto di Fisica, cui furono applicati successivamente sei, otto e dieci elementi Bunsen a grande modello. Le soluzioni erano nello stesso tempo mantenute alla temperatura di 21°. I risultati furono questi:

La materia organica si ammucchiava all'elettrodo negativo, formando una specie di cono attorno alla lamina, ed in breve tempo si formava alla superficie del liquido il solito straterello. Lo sviluppo dei microorganismi (bacilli e bacteri) avveniva in modo normale, come se lo stato delle soluzioni non fosse punto turbato.

d) Influenza del magnetismo.

69. La soluzione da sottoporsi all'esame fu posta in una provetta, la quale verso il fondo era a pareti piane, parallele fra loro e discoste meno di un centimetro.

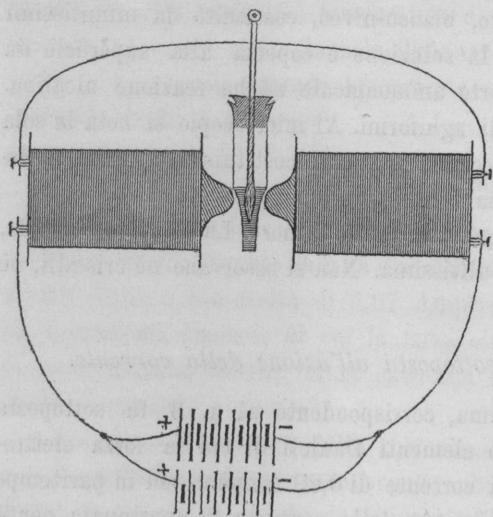


Fig. 5.

La parte inferiore della provetta era fraposta ai due poli magnetici dell'apparecchio di Faraday per lo studio delle sostanze para e diamagnetiche (fig. 5). L'apparecchio elettromagnetico era percorso da una corrente data da 10 coppie Cloris-Baudet (grande modello), associate con 8 coppie Bunsen (grande modello). Le Cloris-Baudet fra di loro erano associate per tensione, così pure le Bunsen fra di loro; ma la Cloris Baudet colle Bunsen erano riunite per superficie. Per tal mezzo l'apparecchio elettromagnetico raggiungeva un massimo d'intensità, da richiedersi una forza da 35 a 40 chilogrammi per staccare un'ancora che ne congiungesse i poli.

70. Riguardo all'azione magnetica abbiamo eseguite cinque serie di esperienze sulla soluzione n. 3 di estratto Liebig, che dal complesso delle ricerche precedenti riconoscemmo la più adatta allo sviluppo dei microorganismi. Confrontando i risultati al microscopio della soluzione magnetizzata con quelli della stessa soluzione, presa per paragone, posta fuori dal campo magnetico, abbiamo potuto convincerci che l'induzione magnetica non ha sullo sviluppo dei microbi che un'azione ritardatrice rispetto al tempo e diminutiva riguardo alla quantità dei microorganismi ed alla loro vitalità. Imperocchè nella soluzione magnetizzata, mantenuta fra 17° e 18°, lo sviluppo del *Bacillus subtilis* non cominciò che dopo 4 o 5 giorni e le forme erano scarse, poco mobili, senza spore anche dopo parecchi altri giorni, mentre nella soluzione di confronto si presentò fra il 2° ed il 3° giorno uno sviluppo di forme organizzate, analoghe a quelle descritte per questa soluzione ai n. 16, 17, 18 (C. b.), che si accrebbe nei giorni successivi.

E. Influenza delle varie luci.

Esame delle soluzioni esposte alla luce bianca solare ed alle diverse luci dello spettro.

71. Le soluzioni n. 1, 3 e 5 di estratto Liebig furono dapprima poste in palloncini di vetro, tinto in rosso, della capacità di circa 100 cc., di cui esse occupavano circa 18 cc., e vennero esposte al sole nel mese di maggio; sicchè la temperatura interna al palloncino durante il dì variava dai 35° ai 60°. I palloncini erano suggellati alla lampada ed erano stati dapprima sterilizzati ad alta temperatura. Essi rimanevano esposti al sole dalle otto ore del mattino alle 5 pomeridiane, e, quando la sera venivano ritirati, erano riposti nel ghiaccio fondente, ove rimanevano fino alle ore otto del mattino seguente. L'esposizione durò 6 giorni ed i risultati sono riferiti più sotto insieme con quelli che si ottennero di poi esponendo alla luce, in luogo soleggiato, le soluzioni in quest'altro modo. Cioè, si avvolse attorno a cinque bicchieri di vetro, ciascuno per ciascuno, una lamina di gelatina colorata trasparentissima. La lamina aveva uno spessore poco superiore a quello di un foglio da lettera, e per questo fu avvolta per due o tre volte attorno ciascun bicchiere. Così attorno al bicchiere veniva costituito un involucro cilindrico colorato, il quale veniva chiuso al di sotto e al di sopra con una triplice lamina di gelatina dello stesso colore. Per tenere a posto la lamina di sopra vi si sovrapponeva un disco di vetro, perfettamente diafano e senza colore. Le tinte della lamina di gelatina erano le seguenti: rosso, giallo, verde, azzurro e violetto. In ciascun bicchiere poi furono poste le tre soluzioni n. 1, 3 e 5 di estratto Liebig, e così vennero esposti alla luce, disponendo i bicchieri in circolo sopra una grande lastra di vetro e coprendoli con un'ampia campana di vetro, senza colore. Sotto la campana fu posto altresì un termometro per rilevarvi, nelle differenti epoche del dì, la temperatura. Le soluzioni furono esposte, notte e dì, per 10 giorni, e si osservò che dal levare al tramontare del sole la temperatura sotto la campana, variò in media fra 25° e 50°, e dal tramonto al sorgere del sole da 14° a 18°. Esse furono esaminate due volte, dopo il secondo ed il decimo giorno. Vennero di poi tolti gl'involucri colorati, e le stesse soluzioni furono lasciate per altri 9 giorni esposte, nelle stesse condizioni, alla luce bianca del sole. I risultati ottenuti sono i seguenti:

72. In tutte le osservazioni, stabilite sulle soluzioni esposte alle luci colorate, si riscontrano sempre gli stessi caratteri, che qui riferiamo: Le soluzioni sono limpide, acide, con odore normale, senza pellicola superficiale, con leggero deposito granuloso. Al microscopio si osservano alcune granulazioni irregolari ed alcuni aghi e tavole cristalline, riferibili alle solite materie estrattive. Manca assolutamente ogni forma organizzata, e nessun indizio s'incontra, nelle diverse osservazioni, che accenni ad uno sviluppo di microorganismi. Le soluzioni, esaminate dopo il 2° ed il 9° giorno, da che erano stati tolti gli involucri colorati e quindi esposte alla luce bianca, non presentarono alcuna mutazione, sia per riguardo all'aspetto che per riguardo al reperto microscopico, da quanto fu detto nell'osservazione precedente.

F. *Influenza dei diversi ambienti gassosi.*

a) *Disposizione delle esperienze.*

73. Trattandosi di rilevare quale sia l'influenza di un dato ambiente gassoso sullo sviluppo dei microorganismi in soluzioni organiche di diversa ricchezza procentica, ci siamo limitati a due gas soltanto, il biossido di carbonio e l'azoto: e ciò pel

fatto che ben poco divario corre fra l'azione di un gas e quella di un altro, quand'essi non esercitano azione chimica sulle soluzioni, per quanto almeno riguarda una condizione più o meno favorevole alla formazione dei microbi.

Il biossido di carbonio fu preparato colla solita reazione dell'acido cloridrico sul marmo (marmo di Carrara) e venne raccolto in un gazometro della capacità di 20 litri. Sotto una campana pneumatica poi, munita di un rubinetto, venne posto un vaso cilindrico di vetro, simile al piezometro d'Oersted, il quale era munito di un'investitura d'ottone, su cui potevasi avvitare un coperchio (fig. 6). Il coperchio era pure munito di un rubinetto e tutto l'apparecchio era a perfetta tenuta di gas, ancorquando fra l'interno e l'esterno fossevi una differenza di pressione d'un'atmosfera. Il rubinetto della campana era messo in comunicazione col gazometro e nel vaso di vetro erano riposte le soluzioni organiche. Allora, tenendo aperto il rubinetto del coperchio

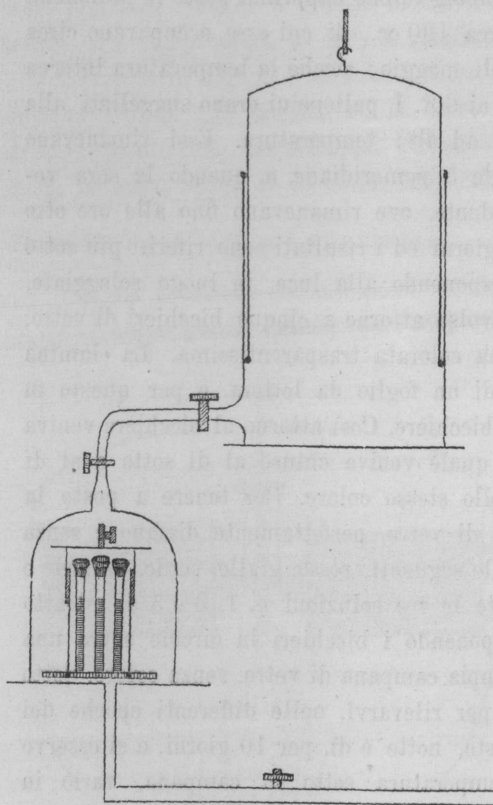


Fig. 6.

del vaso di vetro e chiudendo quello della campana, si faceva dapprima la rarefazione nella campana e quindi nelle soluzioni, la quale era prolungata per un'ora e mezzo

o due, affinchè tutta l'aria venisse snidata; di poi si apriva il rubinetto della campana e si lasciava entrare il biossido di carbonio. Si ripeteva poi dieci volte di seguito nel tempo d'una mezz'ora la rarefazione del gas sotto la campana e l'introduzione del gas stesso, contenuto nel gasometro, affine di recar fuori dalle soluzioni quell'ultima parte di aria che poteva esservi rimasta per la non completa rarefazione operata dalla pompa. Si levava infine lestamente la campana, quand'era stata l'ultima volta ripiena del gas, si chiudeva il rubinetto del coperchio del vaso di vetro e questo veniva portato poi alla temperatura di 37° .

74. Per mantenere le soluzioni organiche in un'atmosfera d'azoto si provvede nel modo seguente. Sovra un grosso disco di vetro lavorato a smeriglio finissimo, fu applicata una campana da macchina pneumatica, pur essa lavorata a smeriglio molto fino. Sotto la campana venne posta una bacinella ripiena con una soluzione satura di acido pirogallico in cui venne altresì disciolta un po' di potassa caustica, preparata all'alcole. Entro la bacinella stessa erano disposte le provette colle soluzioni organiche (fig. 7).

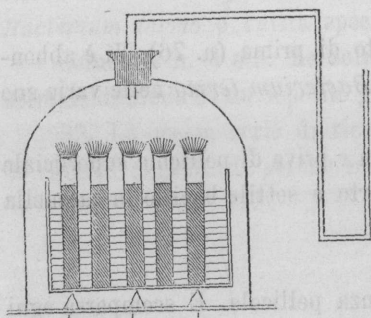


Fig. 7.

L'apparecchio per due giorni veniva tenuto in un ambiente di 0° , ed in questo intervallo di tempo la soluzione alcalina di acido pirogallico assorbiva tutto l'ossigeno e la piccola quantità di acido carbonico dell'aria racchiusa sotto la campana: esso di poi era portato alla temperatura di 15° . Per riconoscere quando l'assorbimento dell'ossigeno era com-

piuto, la campana era munita in alto di un foro, in cui era impegnato un manometro ad aria libera, il quale era letto, nelle medesime condizioni di temperatura e colle debite correzioni relative alla variazione della pressione atmosferica, prima e dopo dell'assorbimento.

b) Esame delle soluzioni sottoposte all'azione del biossido di carbonio.

75. Le soluzioni n. 1, 2, 3, 4 e 5 di estratto Liebig furono mantenute per nove giorni in contatto coll'atmosfera di biossido di carbonio, in pari tempo che la temperatura era mantenuta costante a 37° , e furono esaminate tre volte, dopo il 4^o, il 6^o ed il 9^o giorno. Dopo ciascun esame era subito e prestamente ripetuta tutta l'operazione descritta al N. 73, affine di riporre le soluzioni nelle stesse condizioni, in cui si trovavano prima dell'esame stesso.

Allato del vaso di vetro contenente le soluzioni in esame erano tenute le corrispondenti soluzioni di confronto (in contatto all'aria), le quali esaminate dopo il 1^o, il 2^o, il 3^o, il 4^o, il 6^o ed il 9^o giorno offrirono pressapoco gli stessi risultati, che abbiamo precedentemente descritti per le soluzioni di estratto Liebig tenute a 37° . Per le soluzioni sottoposte all'azione del biossido di carbonio furono questi i reperti:

76. Dopo quattro giorni:

Soluzioni n. 1, 2 e 3. Le soluzioni sono limpide, acide, senza odore, senza pellicola superficiale. Al microscopio si osserva una grande quantità di goccioline adipose. Nessun microorganismo si è sviluppato.

Soluzione n. 4. La soluzione è opalina, acida, coperta da una pellicola biancastra. Si notano al microscopio uno *Streptococco* ed il *Bacterium termo* in discreta quantità, nonché il *Bacterium lineola* molto più copioso.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con discreto deposito sul fondo. Non contiene alcun microorganismo.

77. Dopo 6 giorni:

Soluzioni n. 1, 2 e 3. Le soluzioni sono leggermente opalescenti, acide, d'odore non alterato, con una sottilissima pellicola alla superficie. Vi è un discreto sviluppo del *Bacterium lineola* nella soluzione n. 1, che è molto più abbondante nelle soluzioni n. 2 e 3. Il *Bacterium termo* è raro.

Soluzione n. 4. La soluzione ha lo stesso aspetto di prima (n. 76). Vi è abundantissimo il *Bacterium lineola*, meno abbondante il *Bacterium termo* nelle varie sue forme, e sembra scomparso lo *streptococco*.

Soluzione n. 5. Sebbene la soluzione sia scolorita e priva di pellicola superficiale vi si trova in discreta copia uno stafilococco ed un corto e sottile bacillo in catenella (*Bacillus subtilis*).

78. Dopo 9 giorni:

Soluzioni n. 1 e 2. Le soluzioni sono limpide, senza pellicola. È scomparsa ogni forma organizzata.

Soluzione n. 3. La soluzione è torbida, acida, d'odore inalterato, con discreto strato superficiale. Vi sono molti cocci isolati ed uniti in catenelle; sono rari il *Bacterium lineola* ed il *Bacterium termo*; è comparso un bacillo lungo, sporificato all'estremità e nell'interno (*Bacillus subtilis*).

Soluzione n. 4. La soluzione presenta lo stesso aspetto e lo stesso reperto microscopico della precedente n. 3.

Soluzione n. 5. La soluzione è limpida, acida, con abbondante deposito e con uno strato superficiale formato dall'ammasso di numerose bollicine gasee biancastre. Lo stafilococco vi è sviluppatissimo, ed il bacillo è scomparso.

79. Questa serie di ricerche fu pure ripetuta, ma si conseguirono risultati ben poco diversi dai precedenti.

c) Esame delle soluzioni sottoposte all'azione dell'azoto.

80. Le soluzioni d'estratto Liebig furono tenute per sette giorni nell'atmosfera di azoto alla temperatura di 15°, e quindi vennero esaminate assieme alla soluzione di confronto (in contatto all'aria); per esse si ebbero risultati analoghi a quelli descritti al n. 15 (C. b.) di questo capitolo.

81. Per le soluzioni in contatto con l'azoto si trovò quanto segue:

Soluzione n. 1. La soluzione è opalescente, con micoderma quasi completo, sottile, bianchiccio, dal quale si diffondono verso il fondo delle larghe bende bianchiccie. Essa è senza odore e senza deposito. Sonvi tre specie di batteri: Il *Bacterium lineola*,

prevalente, con una bellissima zooglea; il *Bacterium termo*, meno copioso, pure con zooglea; e un *Bacterium* molto più grosso e più corto del *Bacterium lineola*, con una larga base, una punta smussa e margini curvilinei. Sono frequenti altresì i diplobatteri di questa specie.

Soluzione n. 2. La soluzione è torbida, con micoderma più grosso che nella precedente n. 1, con odore pressochè normale e con piccolo deposito sul fondo. Si osservano le stesse tre forme, più copiose però, che nella soluzione precedente n. 1, con grande prevalenza del *Bacterium lineola*. Vi è anche qualche bacillo lungo, riferibile al *Bacillus subtilis*.

Soluzione n. 3. La soluzione è leggermente opalescente, senza odore, con un micoderma appena distinguibile e con discreto deposito sul fondo. Vi abbonda il *Bacterium lineola* e qualche forma corta, mobilissima del *Bacillus subtilis*. Manca il *Bacterium termo* e l'altra specie non determinata.

Soluzioni n. 4 e 5. Le soluzioni sono limpidissime, senza micoderma, con odore normale di brodo ed un deposito granuloso, amorfo. Manca ogni forma di microorganismi.

82. La stessa serie di ricerche, or ora descritta, fu ripetuta, e ci dispensiamo di riferire i risultati, perchè molto analoghi ai sopradescritti (n. 81).

IV.

Conclusioni.

Dai risultati ottenuti nelle surriferite esperienze crediamo di poter logicamente dedurre le seguenti conclusioni:

1. Per le soluzioni di estratto di carne e di peptone la densità non ha influenza sullo sviluppo specifico (di forme determinate) dei microorganismi.

2. Per le soluzioni di gelatina tale influenza si dovrebbe ammettere per lo sviluppo delle microspore, trovate esclusivamente nelle soluzioni più dense (n. 4 e 5).

3. La densità agisce diversamente sullo sviluppo dei microbi, a seconda della qualità della sostanza organica. Infatti nelle soluzioni di estratto di carne lo sviluppo è più abbondante e più rapido nelle soluzioni poco dense (n. 1, 2 e 3); mentre nelle soluzioni di gelatina è più abbondante e più rapido in quelle molto dense (n. 4 e 5).

4. Nelle soluzioni di estratto di carne, qualunque sia la loro densità, si sviluppano esclusivamente schizomiceti; in quelle di gelatina si sviluppano prevalentemente muffe (*Penicillium*).

5. Nelle soluzioni di peptone si svolgono di pari passo tanto gli schizomiceti che i penicillii.

6. Il limite inferiore di temperatura, che permette lo sviluppo dei microbi, varia colla qualità delle sostanze organiche ed anche colla loro densità. Infatti nelle soluzioni, ad es., meno dense di estratto di carne (n. 1 e 2) i microorganismi compaiono già a 5° dopo undici giorni, mentre a questa temperatura nelle soluzioni più dense non si verificano sviluppi. Solo a 10°, dopo sei giorni, compaiono le forme nelle soluzioni

più dense (n. 4, 5, 6 e 7). E d'altra parte le soluzioni di gelatina rimangono sterili anche per mesi al di sotto di 25°, qualunque sia la loro densità.

7. La densità delle soluzioni organiche ha una sicura influenza sulla temperatura di loro sterilizzazione. Una soluzione di estratto di carne molto densa (n. 5) è sterile a 50°, mentre le soluzioni poco dense (n. 1, 2 e 3) non sono sterili a 60°, anche dopo parecchi giorni che furono mantenute a tale temperatura.

8. A 79°, dopo tre giorni, si manifestano granulazioni che per la forma, per la colorazione e pel moto di traslazione non ci permettono di escluderle in modo assoluto dalle forme organizzate.

9. La nostra soluzione n. 3 (2 %) è la più opportuna per lo sviluppo delle forme, ed il punto di sua sterilizzazione è più alto di quello di tutte le altre.

10. Per le soluzioni di gelatina non si verifica il fatto precedentemente enunciato per le soluzioni di estratto di carne. Infatti mentre a 50° sono sterilizzate le soluzioni meno dense, non lo è la soluzione più densa (n. 5), nella quale si sviluppa ancora il *Penicillium*.

11. La densità delle soluzioni organiche influisce sulla precocità dello sviluppo, della sporificazione e dell'esaurimento. Nelle soluzioni meno dense (n. 1 e 2) lo sviluppo, la sporificazione e l'esaurimento sono assai più precoci che nelle soluzioni più dense (n. 3 e 4).

12. In tutte le soluzioni il *Bacillus subtilis* è forma prevalente alle temperature relativamente alte (superiori ai 30°); il *Bacterium termo* è forma prevalente alle temperature basse (inferiori ai 30°).

13. Nelle soluzioni di estratto di carne in particolare le specie *Bacillus subtilis* Cohn e *Bacterium termo* Duj. si manifestano così multiformi, instabili, col mutare della densità e della temperatura, da rendere quasi impossibile una rigorosa determinazione e da forzare la mente all'idea del polimorfismo. Infatti tutte le forme descritte e che abbiamo riferite a queste specie, non solo quelle a bastoncino, ma anche le ovalari e le sferiche, coltivate nei mezzi nutritivi riprodussero le ordinarie forme del *Bacillus subtilis* e del *Bacterium termo*.

14. Innalzando gradatamente la temperatura delle soluzioni organiche si innalza anche il punto di sterilizzazione in quelle che hanno una densità opportuna. Infatti nelle soluzioni di estratto di carne e di peptone, corrispondenti ai n. 1, 2 e 3, il *Bacillus subtilis* resiste per 24 ore alla temperatura di 79° ed anche a quella di 100°.

15. Un riscaldamento di 2-3 ore, nella pentola di Papin, a 120°-130° non impedisce nelle soluzioni poco dense di estratto di carne, chiuse a fuoco, lo sviluppo di forme sferiche organizzate.

16. I gas acido carbonico ed azoto non hanno che un'azione ritardatrice sullo sviluppo dei microorganismi. Sotto la loro influenza abbiamo però veduto svilupparsi in considerevole quantità, insieme con altre forme, il *Bacterium lineola* Cohn.

17. Un'azione puramente ritardatrice hanno anche il magnetismo e la differenza di potenziale elettrico.

18. L'azione della intensa luce solare, semplice o composta, impedisce assolutamente lo sviluppo dei microorganismi nelle soluzioni organiche di qualsiasi densità.

19. L'azione della corrente elettrica continua è variabile a seconda della qualità della sostanza organica sottoposta ad esame ed a seconda della intensità della corrente.

20. Una corrente di 4 Daniell (0,29 Ampère, 4,22 Volts), agente per 4 giorni sulla soluzione di gelatina n. 3, mantenuta a 37°, ha un potere sterilizzante completo.

21. Una corrente di 2 Bunsen (2,36 Ampères, 3,75 Volts), operante per 2 giorni su una soluzione di estratto di carne nelle più opportune condizioni di densità (soluzione n. 3) e di temperatura (37°), esercita un'influenza puramente ritardatrice sulla produzione dei microorganismi.

22. Una corrente di 4 Bunsen (3,98 Ampères, 7,25 Volts), agente per 2 giorni sulla stessa soluzione e nelle stesse condizioni di temperatura, non permette che lo sviluppo di granulazioni sferiche, vibranti, che non abbiamo potuto rigorosamente dimostrare per micrococchi.

23. Una corrente di 6 Bunsen (5,3 Ampère, 12,5 Volts), agente per 2 giorni sulla stessa soluzione e nelle stesse condizioni di temperatura, sterilizza in modo assoluto la soluzione.

24. Una corrente indotta, debole o forte, non ha alcuna influenza sullo sviluppo dei microorganismi.

Questo nostro studio è incompleto, però quanto abbiamo fatto ci sembra rigoroso e conforme al vero metodo sperimentale. Perocchè quando si cerca di riprodurre colla esperienza un fenomeno naturale è necessario tener conto di tutte le condizioni nella loro giusta misura.

