ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCII.

1905

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIV.

1° SEMESTRE.

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1905

due, poste quasi allo stesso livello dei nefridi, formate da due glandole piriformi ravvicinate e situate sui due lati del piano mediano, inserite sulla faccia ventrale della faringe, tra questa e il cordone nervoso ventrale, piene di elementi sferoidali, alquanto opachi, che sembrano ova; ed in ultimo vanno segnalate numerose sferule di sostanza apparentemente adiposa, che si trova accumulata nella cavità generale del corpo di questo Gefireo, dietro l'ansa intestinale. Il rivestimento esterno di questo animale è costituito da una cuticola trasparente che ricopre un ipoderma cellulare e sotto di questo vi sono i due caratteristici strati muscolari regolarissimi che determinano sulla superficie del corpo, nei punti in cui sono più sviluppati dei rilievi quadrangolari regolari. Non ho potuto constatare sulla superficie esterna del corpo alcun rivestimento di ciglia vibratili.

Dalla descrizione qui data risulta che la *Pelagosphaera Aloysii* Ming., appartiene alla classe dei Gefirei, ordine *Sipunculida* e probabilmente rappresenta una nuova famiglia.

Fisiologia vegetale. — *Pressione e tensione delle cellule di lievito.* Nota del dott. E. Pantanelli [1], presentata dal Socio R. Pirotta.

Nägeli [2] per il primo speculò su le condizioni diosmotiche del lievito, sopratutto su la sua permeabilità, ma non fece misure in proposito. Egualmente Prior [3] ed il suo allievo Elliesen [4] giudicano la permeabilità del lievito da la rapidità con cui i diversi zuccheri vengono fermentati, un criterio abbastanza dubbio, e d'Arsonval [5] ritiene che nell'interno delle cellule di lievito regni una pressione osmotica enorme, forse di qualche migliaio di atmosfere, perchè ha visto che cellule di lievito plasmolizzate con diverse soluzioni saline muoiono nel congelo, a differenza delle cellule intatte, le quali notoriamente resistono anche a — 90° [6].

Mancava dunque qualsiasi misura diretta del turgore del lievito, allorchè intrapresi queste ricerche, in continuazione a i miei studî analoghi su funghi pluricellulari, ma or è un mese è comparsa su questo tema una Memoria

(1) Lavoro eseguito nel R. Istituto Botanico di Roma, 15 giugno 1905.

(2) Nägeli, C. v., *Theorie der Gärung*, 1879, pagg. 39-42, 93, 105.

(3) Prior, E., Centralbl. f. Bakteriol. (2), I, pagg. 445-446 (1895); Ibidem, II, pag. 322 (1896); III. Ibidem, pag. 568; IV. Physiologie und Chemie des Malzes und des Bieres, 1896.

(4) Elliesen, M., Centralbl. f. Bakteriol., (2), VII, pag. 500 (1901).

(5) D'Arsonval, Comptes rendus, CXXXIII, pag. 84 (1901).

(6) Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II, pag. 306 (1901).

di Swellengrebel [1], ciò che mi ha incitato a far noti senza indugio i miei resultati [2].

Il lavoro di Swellengrebel, che ha ripetuto fedelmente per cellule di lievito le ricerche che io avevo due anni or sono eseguito su le muffe, tocca varie delle questioni, che io pure ho studiato. Ma siccome le mie esperienze vennero disposte in modo diverso, anzitutto con scopi diversi da quelli di Swellengrebel, così non è a meravigliarsi, se i miei resultati non sempre collimano con quelli di Swellengrebel. Inoltre egli non ha adoperato culture pure di determinate razze, si è servito del NaCl come sostanza plasmolitica, mentre per questo sale le cellule di lievito sono leggermente permeabili, e sopratutto non ha tenuto conto della *tensione* delle cellule, così che le sue misure di *pressione* prive della correzione dovuta a la tensione hanno un valore relativo [3].

Siccome il metodo crioscopico non è applicabile a le cellule di lievito, perchè non se ne può cavare completamente il succo [4] e questo è tanto ricco di protoplasma, glicogeno, gomma ed altri colloidi, che la misura della sua pressione osmotica non è sicura, come ha dovuto riconoscere Swellengrebel, il quale sperava di poter applicare a le cellule di lievito i metodi da me escogitati per i funghi pluricellulari, così ho dovuto io pure fare uso del solo metodo plasmolitico. Questo consiste notoriamente nel portare le cellule in soluzioni di diversa concentrazione, finchè si trova quella che basta a fare uscire acqua da la cellula, ciò che nel nostro caso si riconosce o per il distacco del protoplasto da la parete o per lo meno per una visibile diminuzione di volume della cellula e dei suoi vacuoli.

Metodi. — Su i metodi di cultura e di semina, come pure su la condotta delle esperienze rimando a la Memoria diffusa. Qui dirò solo che la plasmolisi fu ottenuta con soluzioni di $CaCl_2$ differenti fra loro di 0,25 *is.* [5],

(1) Swellengrebel, Centralbl. f. Bakteriol., (2), XIV, pag. 374 (1905).

(2) Del resto avevo già preannunziato in un mio lavoro, datato da Berlino il 28 giugno 1904, e comparso in Annali di Botanica, II, pag. 195 (10 gennaio 1905), che mi occupavo del lievito. — La presente Nota è il sunto di una Memoria, già consegnata a la stampa.

(3) Sul significato di questi termini e considerazioni vedi Pantanelli E., Nuovo Giornale Botanico, (2), XI, pag. 337 (1904); Jahrbücher f. wiss. Botanik., XL, pag. 314 (1904).

(4) Cfr. Fernbach A., Annales d. Institut Pasteur, IV, pag. 651 (1890). Anche con il metodo di Buchner (Zymasegärung, 1903, pag. 65) si ottiene solo il 60 % del contenuto cellulare.

(5) Sul significato di questa unità osmotica vedi Pantanelli E., Malpighia, XVIII, pag. 102 (1904). Un *is.* è la pressione osmotica di 0,1 Mol. KNO_3, equivale quindi a 4,51 kg. cm^{-2} o 4,367 atm. — Il calcolo della concentrazione osmotica (Hamburger, Osmotische Druck- und Jonenlehre, 1902, I, pag. 14) delle soluzioni di $CaCl_2$ venne fatto su i valori di Dieterici, cfr. Pantanelli, Jahrb. f. wiss. Bot., l. c. pag. 306.

per il qual sale la cellula di qualsiasi lievito è assolutamente impermeabile. Anche la tensione delle cellule fu misurata con il metodo plasmolitico [1].

Soluzioni nutritizie. — Come tipo (soluzione normale) venne preso non il mosto di vino o di birra, la cui composizione è oscillante e non completamente nota, ma una soluzione contenente 1 % NH_4NO_3, 0,5 % KH_2PO_4, 0,25 % $MgSO_4$ (0,52 % $MgSO_4 + 7$ aq.). A questa soluzione aggiungevo 5 -10 % saccarosio cristallizzato o glucosio Merck, come pure sali diversi o altre sostanze in quantità svariate.

Lasciando da parte una lunga serie di esperienze preliminari, parlerò qui dei resultati principali di alcune serie di esperienze. La razza di lievito adoperata fu per lo più una razza isolata da me da lievito in fermentazione di pane casalingo romano. Essa è a fermentazione alta (in parte), è probabilmente un *Cerevisiae* [2], ha cellule grandi, tondeggianti, forma facilmente spore (una per ogni cellula) a 29°, se coltivata in sciroppo di zucchero su blocchetti di gesso. Alcune misure vennero inoltre eseguite con diverse razze di *Sacch. ellipsoideus* isolate da vini italiani, poi con *Sacch. apiculatus*, *Schizosaccharomyces Pombe* e *Torula* (lievito rosa).

Prima Serie. *Culture non aereate, chiuse con colmatore ad* H_2SO_4. *Sostanza fermentiscibile: saccarosio.* — In soluzione *normale* (v. sopra) il turgore sale subito dopo la semina, per effetto della fornitura di alimento, e si mantiene pressochè costante nei primi 3-4 giorni di fermentazione. Ma poi, con la produzione di alcool, glicerina, acidi ecc. aumenta la concentrazione esterna e il turgore sale leggermente, per mantenersi di nuovo costante qualche settimana. In seguito con l'esaurimento dei materiali alimentari, diminuisce di nuovo. Di tutte queste variazioni non si è affatto accorto Swellengrebel. Egli porta in proposito un'esperienza, in cui il suo lievito impuro venne coltivato su decotto di uva secca: in tre giorni il turgore non si mosse, e ciò bastò a l'A. per troncare l'esperienza.

Quanto a la tensione (grado di distensione elastica) delle cellule, essa subisce un forte aumento subito dopo la semina, poi diminuisce, allorchè la gemmazione rallenta per l'azione narcotizzante dell'alcool e dell' CO_2 prodotti nella fermentazione, e torna poi ad aumentare più o meno distintamente quando la fermentazione è cessata.

Mettendo in relazione i valori della tensione con quelli del turgore, si trova che la *pressione* non varia parallelamente a i valori plasmolitici, ma deve continuamente salire dal momento della semina durante la fermentazione fino a che questa è finita ed allora diminuire di nuovo. Questa variazione

[1] Ibidem, pag. 315.

[2] Il lievito della fermentazione panaria si suole ascrivere a i *Cerevisiae*, ciò che fa per lo meno meraviglia, p. es. da noi, dove la fabbricazione della birra non esiste o è stata importata negli ultimi anni. Anche Beijerinck nega che il lievito del pane sia un *Cerevisiae* e lo chiama *Sacch. panis*.

del potenziale cellulare è evidentemente dovuta a l'aumento continuo della concentrazione esterna per la produzione di alcool ed altre sostanze a piccola molecola.

Per le soluzioni *concentrate* colpisce il fatto, che il turgore del lievito si lascia influenzare non solo da la quantità, ma anche da la qualità della sostanza aggiunta, così che ad irritazioni isosmotiche prodotte da sostanze diverse corrispondono reazioni osmotiche di altezza diversa. Così la glicerina e gli zuccheri svegliano reazioni molto molto più ampie (da 6-7 *is.* a 15-17 *is.* per un aumento esterno da 3 a 13 *is.*) dei sali inorganici, fra cui i più impermeabili ($CaCl_2$ e $MgSO_4$) svegliano le reazioni minime (da 6-7 *is.* a 11-12 *is.* per un aumento esterno da 3 a 13 *is.*).

La tensione è minima in soluzioni con molto $CaCl_2$ o $MgSO_4$, ma in KNO_3 è ancor maggiore che in glicerina o zucchero. Essa però varia con l'età un po' diversamente nelle diverse soluzioni: particolarità che qui ometto. Un fatto generale è però che tanto il turgore come la tensione variano con l'età nello stesso modo in soluzioni concentrate come in soluzioni diluite.

Seconda Serie. *Culture aereate* (a la pompa). *Sostanza fermentiscibile: saccarosio.* L'aereazione cambia notevolmente l'andamento delle reazioni osmotiche del lievito. In soluzione normale il turgore aumenta continuamente fino al 12° giorno da la semina, per poi diminuire. La tensione invece sale solo fino al 5° giorno, diminuisce notevolmente fino al 12° giorno e risale dopo, con la vecchiaia. Da ciò risulta che la pressione sale ancora fra il 5° e il 12° giorno. Siccome poi la tensione non è in generale maggiore nelle culture aereate rispetto a le corrispondenti culture non aereate, così il maggior turgore nelle prime è realmente da ascriversi ad una *pressione superiore.* Anche in soluzioni concentrate si osservano press'a poco gli stessi fenomeni, per cui non v'ha dubbio, che l'aereazione favorisca le regolazione osmotiche del lievito di pane romano, al pari che nelle muffe. Swellengrebel invece (l. c. p. 486) ha trovato che il suo miscuglio di lieviti, coltivato su gelatina, aerobicamente e anaerobicamente ha lo stesso turgore. Il lievito da me adoperato si comporta decisamente in altro modo, come mostra anche la

Terza Serie. *Culture su gelatina glucosata*, in scatole Petri, quindi perfettamente aereate. Si ebbero valori di turgore addirittura enormi (fino a 36 *is.* su gelatina normale + 10 *is.* (13,9 %) glicerina), molto maggiori che nelle corrispondenti culture in liquido non aereate (vedi serie seguente), mentre la tensione si mantenne press'a poco a la stessa altezza.

Quarta Serie. *Culture non aereate* (con colmatore). *Sostanza fermentiscibile: glucosio.* — Furono fatte più che altro per paragonarle con quelle della precedente serie. Dettero risultati analoghi a quelli della prima serie.

Risultava dunque fin qui in modo non dubbio, che la razza di lievito in parola compie meglio le reazioni osmotiche se è bene aereata. Nè è da obbiettarsi, che nella seconda serie il maggior turgore fosse dovuto a lo *sco-*

timento delle cellule per il passaggio delle bolle d'aria [1], perchè nelle culture su gelatina si ebbe un turgore anche superiore. Ad ogni modo per togliere ogni fondamento a questa obbiezione, vennero fatte esperienze in corrente di gas inerti, quali l'idrogeno e l'azoto, e di un gas importantissimo nella vita del lievito, l'acido carbonico.

Quinta Serie. *Culture in corrente di idrogeno. Sostanza fermentiscibile: saccarosio o glucosio.* — In soluzione normale, il turgore sale dal 2° a l'8° giorno, mentre la tensione aumenta un poco dopo la semina, poi diminuisce fino al 4° giorno, per risalire leggermente in seguito. Dunque tanto il turgore come la tensione variano in corrente di idrogeno come in culture non aereate (1ª e 4ª serie).

In soluzioni concentrate (ipertoniche al momento della semina), il turgore sale fino al 2° o anche fino al 4° giorno per poi diminuire. La tensione, da minima che è in principio perchè la cellula appena seminata rimane plasmolizzata e solo dopo un giorno o due — forse in seguito alla produzione di alcool — riesce a deplasmolizzarsi, sale continuamente, ma si mantiene sempre minore che in soluzioni diluite. In generale, nell'idrogeno i valori del turgore e della tensione si mostrano quasi eguali a quelli delle corrispondenti culture non aereate. Bisogna però considerare, che l'effetto deprimente della mancanza d'aria viene in parte compensato da l'allontanamento dell' CO_2 (cfr. 7ª serie) e di una gran parte dei prodotti volatili della fermentazione per opera della corrente d'idrogeno che se li trascina con sè [2].

Sesta Serie. *Culture in corrente d'azoto* [3]. *Sostanza fermentiscibile: glucosio.* — Vennero osservati gli stessi fatti come nella serie precedente.

Tutto ciò mostra adunque, che la maggiore ampiezza della reazione osmotica in culture aereate a la pompa (2ª serie) non è dovuta a lo scoti-

(1) Su l'effetto dello scotimento su la moltiplicazione del lievito e la fermentazione gli autori non sono concordi. Lo scotimento è sfavorevole secondo Horvath, Arch. f. ges. Physiol., XVII, pag. 125 (1879), Ray, Comptes rendus, CXXIII, pag, 907 (1895), Rapp, Ber. chem. Ges., XXIX, pag. 1893 (1896), Buchner e Rapp, Zymasegärung, 1903, pag. 375; indifferente secondo Nägeli, Theorie der Gärung, 1879, pag. 88, Chudjakow, Landw. Jahrbücher, XXIII, pag. 428 (1894); favorevole, purchè moderato, secondo Hansen, Comptes rendus du Labor. d. Carlsberg, I. pag. 271 (1879) e Delbrück, Dingler's Polytechnisches Journal, CCLXIII, pag. 530 (1887). Probabilmente le diverse razze si comportano diversamente. Per i bacteri, vedi Galli-Valerio, Centralbl. f. Bakteriol., (1), XXXVII, pag. 151 (1904), e Horvath, l. c.

(2) Su la moltiplicazione del lievito e la fermentazione in atmosfera d'idrogeno cfr. specialmente Chudjakow, l. c.; Rapp, l. c.; Korff, Centralbl. f. Bakteriol., (2), IV, pag. 465 (1898); Buchner e Rapp, Zeitschr. f. Biol., XXXVII, pag. 82, (1899); Buchner, Zymasegärung, pag. 368 e segg.

(3) L'azoto fu adoperato per scacciare l'aria solo da Iwanowski e Obrastzow, Centralbl. f. Bakteriol, (2), VII, pag. 305 (1901), e Kostytchew, Jahrb., f. wiss. Bot., XL, pag. 563, (1904).

mento, che non mancava nelle esperienze della 5ª e 6ª serie, ma a l'influenza benefica dell'aereazione. Di speciale interesse è poi la

Settima Serie. *Culture in corrente di acido carbonico. Sostanze fermentiscibili: saccarosio o glucosio.* — È un fatto ormai assodato, che l'acido carbonico sviluppato nella fermentazione ha un'azione narcotizzante su le cellule stesse che lo producono, al pari dell'altro principale prodotto della fermentazione, l'alcool (1). La cellula di lievito cade in uno stato di anestesia: la gemmazione si arresta, i vacuoli scompariscono, il protoplasma si fa omogeneo e splendente. Le cellule perdono i nessi di gemmazione e si isolano nel liquido, mentre la zimasi, indifferente a le condizioni di anestesia della cellula che l'ha prodotta, continua indisturbata il suo lavorìo di riduzione dello zucchero.

Può la cellula di lievito reagire osmoticamente in atmosfera di CO_2?

Ho ottenuto diversi risultati con le varie razze di lievito.

Nelle cellule di lievito di pane romano, a fermentazione alta, la facoltà di reagire agli stimoli osmotici è molto ridotta o addirittura soppressa in atmosfera di CO_2. Se si seminano le cellule di detta razza in soluzione ipertonica attraversata da la corrente di CO_2, la plasmolisi non scomparisce da le cellule neppure in 3 settimane. Anche in soluzioni ipotoniche, diluite, le oscillazioni del turgore e della tensione, che abbiamo visto compiersi normalmente, sono assai ristrette, però non mancano del tutto. La gemmazione non comincia mai, e il lievito si *agglutina* tenacemente per escrezione di molto muco (2), che si può facilmente dimostrare, oltre che precipitandolo con acido tannico o zucchero di piombo, anche in preparati al violetto di metile, violetto di genziana o bleu di metilene. Una gran parte dello zucchero rimane indecomposto. Evidentemente oltre a la zimasi che già contenevano le cellule prima della semina, non se ne forma più in atmosfera di CO_2.

Invece altri lieviti a fermentazione bassa, per es. il lievito del vino Lambrusco di Modena, che è spiccatamente anaerobio, compiono in corrente di CO_2 reazioni osmotiche con la stessa ampiezza come in culture con colmatore o con tappo d'ovatta e non si agglutinano. Questi lieviti si compor-

(1) Vedi specialmente Ortloff, Centralbl. f. Bakteriol., (2), VI, pag. 676 (1900). Secondo questo A., l'CO_2 danneggia la moltiplicazione del lievito, ma favorisce la fermentazione, evidentemente per pura azione ionica su la zimasi; Boussingault, Agronomie, VII, pag. 82 (1884), aveva già trovato, che l'asportazione dell'alcool e dell'CO_2 favorisce in complesso la fermentazione.

(2) Su l'agglutinazione del lievito vedi Will, Centralbl. f. Bakteriol., (2), IV, pag. 130 (1898); Macfadyen, Ibidem, (1), XXX, pag. 368 (1901); Barendrecht, Ibidem, (2), VII, pag. 623 (1901). Il muco che viene escreto dalle cellule di lievito è senza dubbio quello che forma normalmente nelle vecchie culture il « gelatinöse Netzwerk » descritto e figurato da Hansen. Su le sostanze albuminali o simili emesse in diverse circostanze dal lievito vedi Pasteur, Ann. chim. et phys., LVIII, pag. 323 (1858); Nägeli, l. c., pag. 93; Prior, l. c. (1896); Béchamp, Comptes rendus, LXXXVIII, pag. 474 (1879); Lintner, Centralbl. f. Bakteriol., (2), V, pag. 793 (1899); Issajew, Zeitschr. ges. Brauwesen, XXIII, pag. 796 (1900).

tano dunque come il lievito di Swellengrebel, il quale, con troppa fretta, enuncia come fatto generale che « il turgore del lievito è indipendente da l'aereazione ». Egli non ha del resto indicato, se il suo lievito è a fermentazione alta o bassa.

Regolazioni osmotiche. — Infine venne studiato il potere regolatore delle cellule di lievito di fronte a variazioni improvvise della concentrazione esterna. In complesso, il lievito da me adoperato si comporta come quello di Swellengrebel quanto a l'ampiezza e la velocità della catatonosi e della anatonosi, che si compiono nel lievito assai più adagio che nelle muffe, e quindi non mostrano le oscillazioni susseguenti [1]. Però nel lievito di pane in questione il turgore oltrepassa sempre nel primo periodo dell'anatonosi (2 o tre ore dopo l'aumento della concentrazione esterna) il valore di equilibrio finale, per poi ridiscendere lentamente ad esso, ciò che Swellengrebel (l. c. pagg. 484-485) nega per il suo lievito.

Un fatto importante è che il potere di regolazione del turgore, sia in aumento, sia in diminuzione, va riducendosi con l'età. Per eliminare la fonte di errore proveniente dal fatto, che con l'aggiunta di nova soluzione nutritizia o no si cambia la concentrazione degli alimenti e dei prodotti, e quindi si modificano radicalmente le condizioni dell'attività cellulare, ho disposto sempre culture doppie, parallele, seminate di egual quantità di un medesimo lievito. Una delle due culture veniva filtrata al momento dell'esperienza e il liquido filtrato, che si trovava quindi a lo stesso punto di fermentazione del liquido dell'altra cultura, ma conteneva 10 *is.* di un sale in più o in meno, veniva aggiunto a l'altra cultura, così che il lievito si trovava esposto a la sola variazione di $\pm$ 5 *is.* di sale, mentre la concentrazione di tutte le altre sostanze restava invariata. Con questo metodo ho potuto stabilire, che mentre il 2°-4° giorno dopo la semina l'ampiezza di regolazione arriva a $\pm$ 6-7 *is.*, per un salto di $\pm$ 5 *is.* nella concentrazione esterna, dopo 7 o più giorni di fermentazione la reazione si riduce a $\pm$ 2-3 *is.*, per la stessa variazione esterna. Inoltre aumenta sempre il numero di cellule che muoiono per la brusca variazione osmotica esterna.

Risulta quindi, che appunto i due fattori, a cui Swellengrebel ha negato valore — ciò che del resto può esser giusto per la miscela di lieviti da lui adoperata — cioè l'*aereazione* e l'*età* o, se si vuole, lo *stadio di fermentazione*, influenzano in misura amplissima la facoltà di reazione osmotica di determinati lieviti. Ora, siccome il potere di regolazione osmotica è l'indicatore dell'attività cellulare più fedele e più delicato che stia a nostra disposizione, si può concludere da queste ricerche, che bisogna andar cauti nel dichiarare « anaerobio facoltativo » qualsiasi lievito alcoolico. Pare invece che il lievito sopravviva a periodi anaerobii solo perchè cade in narcosi più o meno profonda.

[1] Per le cellule delle muffe ho stabilito (v. lavori citati), che da la rapidità della prima reazione osmotica dipende la comparsa di oscillazioni susseguenti del turgore.