

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVII.

1910

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIX.

2° SEMESTRE.



ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1910

sottilissima patina rosso-bruna dovuta probabilmente alla sopraossidazione del ferro ferroso.

La sua densità è invece molto più elevata che non nelle altre varietà di uvarowite, essendo essa pari a 3,81.

Per quanto riguarda i caratteri ottici ho notato come essa presenti sensibili anomalie ottiche; quando si tratta degli accentramenti cristallini esse si manifestano con una birifrazione assai forte e con estinzioni ondulate; in una sezione ottenuta da un piccolo cristallo normalmente a uno degli assi principali ho potuto notare, sebbene in modo assai confuso, la suddivisione in settori propria delle dette sezioni nei granati anomali.

Batteriologia casearia. — Ricerche sui cocchi acido-presamigeni del formaggio (*Micrococcus casei acido-proteolyticus I e II*)⁽¹⁾. Nota del prof. COSTANTINO GORINI, presentata dal Socio A. MENOZZI.

Come sono venuto dimostrando in un seguito di lavori (1), le mie ricerche mi hanno condotto a stabilire che la flora fondamentale del formaggio di Grana e di altri formaggi a pasta cotta (Emmenthal, Edam ecc.) è costituita da due categorie di batteri, e cioè: 1° da fermenti lattici; 2° da fermenti acido-presamigeni.

Per tal guisa ho potuto dare consistenza alla mia antica ipotesi (2) a proposito di questa seconda categoria di batteri e formulare, contro l'esclusivismo della teoria dei fermenti lattici, una teoria più larga, secondo la quale alla maturazione dei formaggi a pasta cotta parteciperebbero entrambe le suddette categorie di batteri.

Fra i fermenti acido-presamigeni da me segnalati nei formaggi, figurano anche diversi tipi di cocchi.

Freudenreich e i suoi allievi, sostenitori della teoria dei fermenti lattici, pur avendomi dato in parte ragione, riconoscendo la presenza costante di cocchi acido-presamigeni nel formaggio Emmenthal, non avevano mai voluto attribuire a questi il posto che, a mio credere, loro spetta accanto ai fermenti lattici. Basterà che io citi, per tutti, Orla Jensen (3), il quale nella sua biografia del compianto Freudenreich, insiste nel giudicare che l'intervento dei cocchi acido-presamigeni nella maturazione dell'Emmenthal è tutto al più condizionata, come sarebbe a dire casuale (*unter Umständen*).

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nel Laboratorio di Batteriologia della R. Scuola Superiore di Agricoltura di Milano. I numeri si riferiscono alla Bibliografia che trovasi alla fine del presente lavoro.

Gli è soltanto in questi ultimi giorni che un antico allievo di Freudenreich, il dott. Thöni (4), ritornando sulle indagini del Maestro, sotto la guida del prof. Burri, ha dichiarato senza limitazioni, in un pregevole lavoro, che la *flora fondamentale dell'Emmenthal è costituita da fermenti lattici e da cocchi* (che sono poi i suddetti cocchi acido-presamigeni)

Mi preme di far notare che Thöni è arrivato a questa conclusione in base all'analisi di formaggi fabbricati in grandezza normale e coi metodi abituali; imperocchè, dice Thöni, nei formaggi sperimentali di dimensioni ridotte il contingente dei cocchi è molto minore. Questo risultato starebbe in contraddizione con quanto aveva osservato in precedenza Orla Jensen (3), secondo il quale, i cocchi acido-presamigeni sono più abbondanti negli Emmenthal piccoli che nei grandi. Comunque sia di ciò, mi permetto di prendere da qui occasione per ribadire la necessità, da me ripetutamente messa in luce, che le esperienze casearie, per riuscire concludenti per la pratica, siano eseguite su scala normale e in condizioni normali di fabbricazione.

Un altro lavoro che è venuto di recente in sostegno delle mie ricerche è lo studio molto accurato di Harding e Prucha (5) sul formaggio Cheddar. Questi sperimentatori americani, come del resto anche il Thöni, confermano quanto io aveva dimostrato da tempo, che cioè cocchi acido-presamigeni si incontrano nei formaggi puranco in periodi di maturazione inoltrata.

Si ricordi che Freudenreich e la sua scuola asserivano invece, che essi scompaiono dai formaggi subito dopo i primissimi giorni di fabbricazione.

Posso dire adunque con sincero compiacimento, che nelle linee generali entrambi gli studi nuovissimi degli egregi colleghi stranieri, si accordano coi miei.

Dove non mi trovo completamente d'accordo con loro è sopra alcuni particolari che riflettono la diagnosi, la classificazione e la denominazione dei batteri in questione; per cui ritengo opportuno di esporre qui brevemente il frutto delle mie osservazioni in proposito.

1. *Diagnosi dei cocchi acido-presamigeni.* — Un primo ordine di osservazioni riguarda la via che deve guidarci nella ricognizione dei cocchi acido-presamigeni.

In generale, si ha l'abitudine di badare semplicemente se nelle culture a piatto, allestite coi formaggi, si sviluppino delle colonie di cocchi che fondono la gelatina. Ora io penso che ciò non è sufficiente per assicurarci sulla presenza di cocchi acido-presamigeni.

Infatti, ciò che importa veramente di stabilire, dal punto di vista dell'ufficio di questi batteri nel formaggio, non è già il loro potere proteolitico sulla gelatina, bensì il loro potere proteolitico sulla caseina; importa cioè di verificare: 1) Se sono in grado di peptonizzare la caseina; 2) Se sono in grado di peptonizzarla anche in ambiente acido.

Imperocchè, si è precisamente in base alla proprietà di attaccare la ca-

seina in reazione acida, che io ho fondata la mia ipotesi circa la partecipazione dei batteri acido-presamigeni alla maturazione dei formaggi.

Ora, sta di fatto, e l'ho dimostrato io stesso nei miei lavori, che i batteri solubilizzanti la caseina sono in pari tempo fondenti la gelatina. Ma non bisogna dimenticare che non è punto agevole precisare nelle culture se i cocchi in questione sono capaci di liquefare la gelatina, specialmente in seno alle piatte dove essi crescono in simbiosi con altre specie microbiche. Talora, del resto, anche le colonie di una medesima specie di cocco, se si trovano in soverchio numero entro una medesima piatta, possono riuscirsi di reciproco impedimento allo sviluppo, e quindi di reciproco ostacolo alla produzione dell'enzima proteolitico. Inoltre, piccole variazioni nella temperatura, nella reazione, nella densità, nella composizione della gelatina, oppure altre cause non peranco conosciute, possono intralciare l'azione liquefacente di questi cocchi. Per cui, innanzi di escludere questa capacità in una data specie di cocco, bisogna averne allestito un grande numero di culture pure, cambiando le condizioni di sviluppo. Tutte queste difficoltà si comprendono tanto più quando si pensi che fra cotali cocchi ve ne sono alcuni, i quali possiedono un potere di fusione molto debole, che può ritardare anche parecchi giorni a palesarsi; parecchie volte anzi non si assiste mai ad una vera liquefazione, sibbene ad un tenue rammollimento, ad una evaporazione, ad una escavazione della gelatina attorno alla colonia coccica.

Ma ancora non basta. Io ho dimostrato altresì, in un precedente lavoro (6), che esistono dei batteri, i quali, evidentemente per particolari condizioni disgenesiche, nelle culture in gelatina non manifestano alcuna azione proteolitica, mentre la rivelano nelle culture eugenesiche in latte. Un primo esempio di cotali batteri lo diedi in quel bacillino, che ho isolato dai condotti galattofori di una mammella ammalata per cattiva mungitura, e che ho descritto sotto il nome di *Bacillus minimus mammae* (6). In quella circostanza dissi anche come il diverso comportamento di detto microbio sulla gelatina e sulla caseina mi avesse, sulle prime, fatto pensare ad una specificità della sua facoltà proteolitica; ma dimostrai altresì come riuscissi a dissipare questa supposizione dopo che ebbi potuto verificare nelle sue culture in latte un potere peptonizzante anche sulla gelatina.

Avvertii fin d'allora che un altro esempio consimile lo avevo notato in uno dei tipi di cocchi acido-presamigeni del formaggio di Grana. Trattasi infatti anche qui di cocchi, i quali, al pari del *Bacillus minimus mammae*, si sviluppano piuttosto stentatamente sulla gelatina, sia con lattosio, come senza lattosio, e sia a temperature basse come a temperature elevate; per cui ben si spiega se nelle culture in gelatina essi non riescano a elaborare enzimi proteolitici. Quando però vengano coltivati in latte, nelle condizioni *optimum* di sviluppo così da arrivare a peptonizzare la caseina, allora si constata che i loro prodotti sono dotati anche di azione peptonizzante sulla gelatina.

Tutto ciò sta a provare che per la diagnosi dei cocchi acido-presamigeni dei formaggi conviene tener conto piuttosto del loro potere proteolitico sulla caseina, anzichè del loro potere proteolitico sulla gelatina.

Naturalmente non è a credere che la capacità solubilizzante sulla caseina sia sempre di accertamento pronto; non mancano casi di cocchi che stentano ad esplicare questa loro proprietà nelle culture in latte oppure anche la esplicano con una certa irregolarità a seconda della temperatura di incubazione, della età della cultura ecc. Sarà bene pertanto anche qui di non accontentarsi di giudicare da poche culture, sibbene consultarne parecchie, tenendole in condizioni diverse di sviluppo. Però le variazioni nella elaborazione dell'enzima proteolitico in latte si fanno sentire molto meno che in gelatina, evidentemente per il fatto che il latte rappresenta il *medium optimum* di vita per questa sorta di batteri.

2. *Differenziazione dei diversi tipi di cocchi acido-presamigeni.* — Un secondo ordine di osservazioni riguarda la differenziazione dei diversi tipi di cocchi acido-presamigeni che si incontrano nei formaggi.

Anche questo compito non è dei più semplici. Prova ne sia che il parere degli autori è molto discorde. Freudenreich e Orla Jensen (7) ammettono nell'Emmenthal una sola specie di simili cocchi, denominandola *Micrococcus casei liquefaciens*; Harding e Prucha (5) invece nel Cheddar descrivono quattro specie con sei sottospecie che chiamano *M. Lactis albidus* (2 gruppi); *M. lactis giganteus*, *M. lactis varians* (4 gruppi), e *M. lactis brevis*. Thöni (4) non precisa il numero delle specie trovate nell'Emmenthal, ma lascia comprendere che sono più di una certamente.

Dal canto mio, come già annunciai in un lavoro precedente, ho riscontrato parecchie varietà di cocchi acido-presamigeni tanto nel Grana, quanto nell'Emmenthal e nell'Edam; ma le indagini fatte non mi permettono di raggrupparle nè sotto una sola specie, nè in un numero determinato di specie ben caratterizzate.

Poichè si tratta sempre di batteri di forma coccica, i quali hanno di comune le proprietà acidificanti e proteolitiche in latte, i criteri sui quali gli autori fondano le loro differenziazioni sono desunti o dalle dimensioni individuali, o dalla forma, dalla struttura, dal colore delle loro colonie. Non vi è dubbio che questi caratteri presentano delle diversità degne di nota; senonchè se si volesse tener calcolo di tutte queste diversità bisognerebbe creare troppe specie; d'altra parte alcuni di tali caratteri sono troppo incostanti per essere assunti come contrassegni di una specie; tutto al più essi potrebbero servire per fissare delle varietà. Di fronte a tante difficoltà di classificazione, io preferisco rinunciare così ad un'eccessiva suddivisione di tipi, come alla creazione di tipi non abbastanza definiti; e mi limito, almeno per ora, a riunire i diversi tipi in base al loro comportamento nelle culture pure in gelatina comune lattosata.

Dico *nelle culture pure*, per escludere le culture miste nelle piatte; perchè, come già ricordai, quivi il comportamento dei cocchi acido-presamigeni può essere modificato dalla simbiosi con altre specie batteriche.

Dico in *gelatina comune lattosata*, che è la gelatina Koch con lattosio al 2 %, per escludere quelle altre qualità di gelatine al siero di latte, al latte ecc., la cui preparazione è troppo variabile e la cui composizione è troppo incostante, a seconda degli autori.

La mia esperienza mi ha fatto constatare che per tal via si possono stabilire due gruppi di cocchi acido-presamigeni; imperocchè vi sono cocchi, i quali si sviluppano abbondantemente in gelatina e la fondono, di contro ad altri cocchi, i quali si sviluppano scarsamente in gelatina e non la fondono. I due gruppi verrebbero quindi ad essere costituiti: l'uno da cocchi acido-presamigeni fondenti la gelatina, l'altro da cocchi acido-presamigeni non fondenti la gelatina nelle culture. Convieni peraltro subito aggiungere che se questo secondo gruppo non è capace di liquefare la gelatina nelle culture, è però capace di elaborare, nelle culture in latte, un enzima che è proteolitico non solamente per la caseina, ma anche per la gelatina.

È adunque un raggruppamento fisiologico di questi cocchi che io propongo.

Evidentemente, nel costituire un tale raggruppamento fisiologico dei cocchi acido-presamigeni dei formaggi non si può tener conto nè delle loro dimensioni, nè di altri caratteri morfologici; tuttavia, senza escludere che cocchi di diverse foggie e dimensioni si trovino tanto in un gruppo quanto nell'altro, credo prezzo dell'opera dare qui le figure dei due tipi di cocchi, che nelle mie ricerche ho incontrato più di frequente a rappresentare i due gruppi sunnominati. Le note principali per cui questi due tipi diversificano fra loro si possono desumere dai seguenti risultati di *numerose culture comparative*:

a) *Dimensioni e foggia dei cocchi*. Il tipo I (fig. 1) ha un diametro medio di oltre 2μ ; il tipo II (fig. 2) ne ha uno di appena 1μ . Il tipo I è prevalentemente di forma rotonda, e spesso assume la figura di diplococchi a chicco di caffè; il tipo II è prevalentemente di forma ovale, talora anche lanceolata. Entrambi si colorano coi colori di anilina ed anche col Gram.

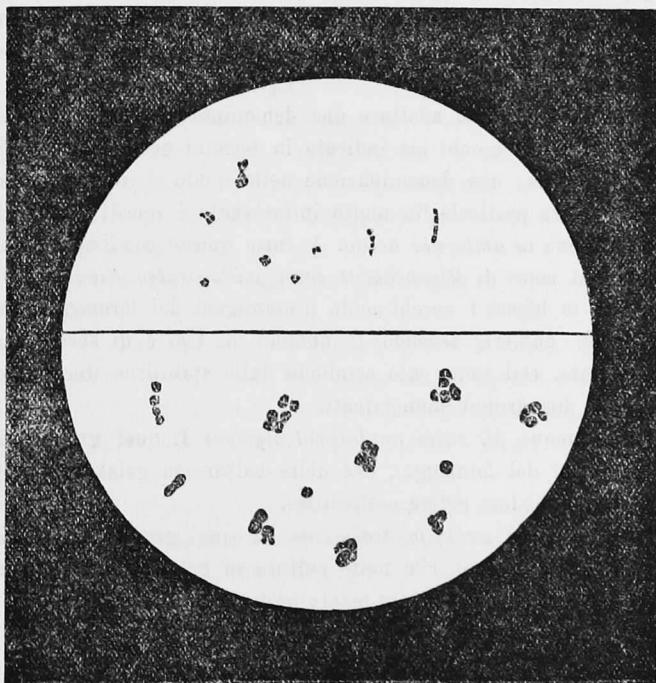
b) *Sviluppo nei substrati artificiali (gelatina, agar, brodo)*. Entrambi si sviluppano fra 20° e 37° C.; e in un tempo variabile fra 18 e 48 ore a seconda della temperatura di incubazione. Il tipo I ha però sempre uno sviluppo abbondante, laddove il tipo II ha sempre uno sviluppo tenue e mostra una maggiore predilezione per le temperature elevate.

c) *Colonie in gelatina lattosata (2 %)*. Entrambi formano colonie rotondegianti, di colore giallognolo, più o meno intenso, talora anche biancastro, evidentemente a seconda della maggiore o minore densità di aggregamento. Le colonie del tipo I raggiungono un diametro di 1-2 mm. e

fondono la gelatina; mentre le colonie del tipo II stentano assai a toccare il $\frac{1}{2}$ mm. anche in capo a 10-15 giorni e non fondono la gelatina.

d) *Comportamento in brodo lattosato (2 %)*. Il tipo I intorbida diffusamente il brodo; il tipo II lo lascia chiaro e si raccoglie tutto sul fondo della provetta, tranne qualche grumo galleggiante.

e) *Comportamento in latte*. Entrambi coagulano il latte fra 25° e 37° C., in 18-24 ore con reazione acida e poi lo ridisciogliono (peptoni-



ficano) sempre in reazione acida crescente; differenza degna di nota si è che il siero dato dal tipo II è sempre più acido, più chiaro e meno giallo del siero dato dal tipo I nelle medesime condizioni di sviluppo.

3. *Denominazione dei cocchi acido-presamigeni*. — Un terzo ordine di osservazioni riflette la denominazione dei cocchi acido-presamigeni.

Anche qui gli autori non si trovano d'accordo. Thöni (4) non si occupa affatto [di dare nomi ai cocchi da lui trovati nell'Emmental. Harding e Prucha (5) assegnano, come abbiamo visto, alle loro diverse specie e sottospecie di cocchi, nomi diversi, nei quali si tien conto solamente dei carat-

teri morfologici. Ora siccome noi abbiamo aggruppato i cocchi secondo criteri fisiologici, così non possiamo accogliere una tale nomenclatura. Freudenberg e Orla Jensen (7) hanno battezzato la loro unica specie col nome di *Micrococcus casei liquefaciens*. Questa denominazione che avrebbe il vantaggio di fondarsi sopra i caratteri fisiologici, mi sembra impropria ed insufficiente, per due motivi, che emergono nettamente da quanto ho detto più sopra, cioè: 1° perchè l'importanza di questi cocchi nei riguardi del formaggio non sta nel loro potere *liquefaciente* sulla gelatina, bensì nel loro potere peptonificante sulla caseina; 2° perchè con quella denominazione si rischierebbe di escludere quei cocchi che, pur avendo facoltà proteolitiche, non manifestano, per le ragioni sovraesposte, proprietà liquefacenti nelle culture in gelatina.

Io preferisco pertanto adottare una denominazione nella quale il potere proteolitico di questi cocchi sia indicato in termini generali e non limitatamente alla gelatina; una denominazione nella quale si trovi inoltre contemplata anche l'altra particolarità molto interessante di questi cocchi, di peptonizzare la caseina *in ambiente acido*. A tutte queste condizioni parmi possa corrispondere il nome di *Micrococcus casei acido-proteolyticus* che propongo per designare in blocco i cocchi acido-presamigeni del formaggio, salvo poi crearne diversi numeri, secondo il numero di tipi o di specie che se ne vuole ammettere. Dal canto mio comincio dallo stabilirne due numeri corrispondenti ai due gruppi sunnominati.

Chiamo dunque *M. casei acido-proteolyticus* I, quel gruppo di cocchi acido-presamigeni del formaggio, che nelle culture in gelatina si sviluppano bene e vi rivelano il loro potere proteolitico.

Chiamo *M. casei acido-proteolyticus* II, quel gruppo di cocchi acido-presamigeni del formaggio, che nelle culture in gelatina si sviluppano stentatamente e non vi rivelano il loro potere proteolitico.

RIASSUNTO.

1. Le ricerche recenti di vari autori sul contenuto microbico di formaggi a pastacotta (Emmenthal, Cheddar), vengono a riconoscere ai batteri acido-presamigeni il posto importante che io ho loro assegnato da tempo fra gli agenti di maturazione dei formaggi stessi, accanto ai fermenti lattici.

2. La diagnosi dei cocchi acido-presamigeni dei formaggi deve essere fondata non in base al loro potere liquefacente nelle culture in gelatina, sibbene in base al loro potere peptonizzante nelle culture in latte. Ciò per i motivi seguenti: *a*) ciò che importa veramente di verificare è precisamente la facoltà di questi cocchi di attaccare la caseina anche in ambiente acido, e non già la facoltà di fondere la gelatina; *b*) la produzione dell'enzima proteo-

litico da parte di questi cocchi nelle culture in gelatina è di constatazione incerta; poichè essa va soggetta a variazioni, a irregolarità molto più numerose e incostanti che nelle culture in latte; c) fra questi cocchi vi sono dei tipi, i quali, verosimilmente in causa di speciali condizioni disgenesiche in gelatina, non rivelano il loro potere proteolitico nelle culture in gelatina, mentre nelle culture in latte essi secernono un enzima che possiede facoltà proteolitiche anche per la gelatina.

3. La differenziazione dei diversi tipi di cocchi acido-presamigeni che si incontrano nei formaggi non è troppo facile, a cagione dell'incostanza di parecchi dei loro caratteri. Volendo evitare tanto un'eccessiva suddivisione di tipi, quanto la creazione di tipi non abbastanza ben definiti è consigliabile (per il momento almeno) di riunirli in due gruppi fisiologici in base al loro diverso comportamento nelle culture in gelatina; vale a dire: un primo gruppo formato dai cocchi che nelle culture in gelatina si sviluppano bene e vi rivelano il loro potere proteolitico; e un altro gruppo costituito dai cocchi che nelle culture in gelatina si sviluppano stentatamente e non vi rivelano il loro potere proteolitico.

4. La denominazione che meglio si presta per designare in blocco tutti i tipi di cocchi acido-presamigeni che si incontrano nel formaggio è quella nella quale la loro facoltà proteolitica sia considerata dal punto di vista generale e non con semplice riferimento alla gelatina, e nella quale inoltre sia indicata la loro proprietà che è particolarmente interessante per la maturazione del formaggio (peptonizzazione della caseina anche in ambiente acido).

Come denominazione collettiva che risponde a siffatti postulati propongo la seguente: *Micrococcus casei acido-proteolyticus*, stabilendone due gruppi:

a) *M. casei acido-proteolyticus* I, gruppo dei cocchi acido-presamigeni che rivelano le loro facoltà proteolitiche anche nelle culture in gelatina;

b) *M. casei acido-proteolyticus* II, gruppo dei cocchi acido-presamigeni che non rivelano le loro facoltà proteolitiche nelle culture in gelatina.

5. Il fatto, da me dimostrato, che nel gruppo dei batteri acido-presamigeni-proteolitici ne esistono alcuni, i quali non sono capaci di rivelare il loro potere proteolitico nelle culture in gelatina, conduce ad ammettere che l'intervento di un tal gruppo di batteri nel formaggio debba essere più abbondante e più importante di quanto possa risultare dalla comune analisi batteriologica dei formaggi, che vien fatta mediante le solite piatte in gelatina.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) GORINI. Diversi lavori che sono poi riassunti nei due seguenti: R. Ist. Lomb. Sc. e lett. 1904, 37, p. 939 e Rend. R. Acc. Lincei, 1905, XIV, 2° sem.
- (2) GORINI. Giornale della R. Società Italiana d'Igiene, 1894, XVI, n. 4.

- (3) ORLA JENSEN. *D. Eduard von Freudenreich* (1852-1906) Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1906.
- (4) THÜNI. *Beitrag z. Kenntniss d. Bakterienflora von nach Emmentalerart bereiteten Käsen-Ladvv.* Jahrb. d. Schweiz, 1909.
- (5) HARDING e PRUCHA. *The bacterial flora of Cheddar Cheese.* Technical Bulletin, n. 8 of the New-York Agricultural Experiment Station. Geneva, N. Y. December 1908.
- (6) GORINI. *Il Bacillus minimus mammae.* Rendiconti R. Ist. Lomb. Sc. e lett. 1907, p. 947 e 1908 p. 122. V. anche *Revue générale du lait*, 1907, VI, n. 24.
- (7) FREUDENREICH e ORLA JENSEN. Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1904.

E. M.