

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

nella resina rossa che si ottiene dalla scomposizione termica dell'acido benzilico, dalla quale non credo si siano mai potute isolare sostanze cristallizzate ⁽¹⁾. Mi sono proposto, perciò, di studiare il prodotto resinoso rosso dell'acido benzilico, più facilmente accessibile; e spero di poter riferirne tra breve.

Microbiologia. — *Ulteriori ricerche sull'attività proteolitica dei fermenti lattici.* II. *L'influenza del substrato* ⁽²⁾. Nota del prof. COSTANTINO GORINI, presentata dal Socio G. BRIOSI ⁽³⁾.

Nell'anno 1907 ⁽⁴⁾, descrivendo un tipo di batterio acido-presamigeno isolato dalle mammelle vaccine, davo il primo esempio di un fermento lattico il quale rivelava il proprio potere proteolitico solamente nelle culture in latte e non nelle culture in gelatina. Nell'anno 1910 ⁽⁵⁾, descrivendo un tipo di cocco acido-presamigeno isolato dal formaggio, davo un secondo esempio di mancata corrispondenza proteolitica fra le culture in gelatina e le culture in latte di un medesimo fermento lattico. Venni così a mettere sull'avviso che la incapacità di liquefazione della gelatina non fornisce un criterio bastevole per escludere l'azione peptonizzante di un dato fermento lattico sulla caseina ⁽⁶⁾. Dimostrai, peraltro, che tale diverso comportamento non è attribuibile ad una differenza fra l'enzima proteolitico agente sulla gelatina e quello agente sulla caseina; infatti, se si prende della gelatina sterile, la si fonde, la si addiziona di qualche goccia di lattocultura peptonizzata dei suddetti batteri, la si mette solo per qualche ora alla temperatura di digestione, e la si riporta poi alla temperatura ambiente od anche in ghiaccio, essa, a differenza della gelatina di controllo, non risolidifica più, dando così segno indubbio che la sua peptonizzazione è avvenuta in grazia dell'enzima proteolitico che era contenuto nella lattocultura aggiunta ⁽⁷⁾.

A spiegazione del non parallelismo della gelatinocultura colla lattocultura io addussi allora la deficiente attitudine eugenesica della gelatina verso quei tipi di batteri, i quali effettivamente nella gelatinocultura si sviluppavano

⁽¹⁾ A. Jena, Ber., II (1869); Nef, Lieb. Ann., 298, pag. 241.

⁽²⁾ Lavoro eseguito nel Laboratorio di batteriologia della Scuola superiore di agricoltura di Milano.

⁽³⁾ Pervenuta all'Accademia il 25 ottobre 1915.

⁽⁴⁾ Gorini C., Il *Bacillus minimus mammae*, in Rendic. Ist. lomb. sc. e lett., 1907, pag. 947; 1908, pag. 122.

⁽⁵⁾ Gorini C., I cocci acido-presamigeni del formaggio, in Rendic. R. Acc. Lincei, 1910, pag. 150.

⁽⁶⁾ Le mie ricerche furono poi confermate da vari autori, fra cui S. H. Ayers di Washington (28° Annual Report of the Bureau of animal industry of the U. S. Department of agriculture, 1911, pag. 229).

⁽⁷⁾ Ved. anche il mio lavoro *Sui presami animali e microbici*, in Rend. R. Ist. lomb. sc. e lettere 1908, XLI, pag. 117.

stentatamente. Senonchè, in seguito, ho incontrato altri tipi di fermenti lattico-caseolitici i quali non fondevano la gelatina, sebbene vi si sviluppassero rigogliosamente; per tali casi adunque era necessario di cercare un'altra interpretazione del contraddittorio comportamento in gelatina. Questa ricerca forma oggetto della presente Nota.

* * *

Data l'insufficienza della gelatinocultura a svelare l'attività proteolitica dei fermenti lattici, è chiaro che, se si ricorre alle piatte in gelatina per l'isolamento dei fermenti latticocaseolitici, bisogna trapiantare in latte non solamente le colonie fondenti ma anche tutte le colonie non fondenti, come praticai appunto nei miei primi studi sull'argomento.

Desiderando evitare spreco di tempo e di materiale, ho pensato che si sarebbe potuto agevolare il compito allestendo le culture a piatto non più in gelatina, ma in agar addizionato di latte, che è quanto dire in latte reso solido coll'aggiunta di agar. Per preparare questo agarlatte, parvemi superfluo di ricorrere all'aggiunta di estratto di carne e peptone come si usa per il comune agar nutritivo; dappoichè si tratta di germi propri del latte, basta offrir loro un agarlatte nel quale l'agar serva esclusivamente da solidificante. A tal uopo faccio una soluzione semplice di agar in acqua al 2 %, che distribuisco e sterilizzo in provette o in boccette; al momento dell'uso la faccio fondere, vi mescolo del latte sterilizzato nella proporzione di 1 su 2 e poi verso nelle piatte l'agarlatte. Per prevenire una intempestiva parziale solidificazione dell'agar, è consigliabile di riscaldare il latte a circa 50° C. prima di mescolarlo coll'agar; la seminazione può esser fatta per *disseminazione* nell'agarlatte tuttora liquido a 40° C., prima di versarlo nella piastra, oppure per *strisciamento* sull'agarlatto già solidificato nella piastra. A meno che si tratti di germi anaerobii obbligati, è preferibile questa seconda maniera perchè riesce più facile di ravvisare le colonie caseolitiche.

Le colonie caseolitiche spiccano sul fondo biancastro opaco dell'agarlatte per il fatto che attorno ad esse si forma una zona chiara di limpidificazione, dovuta alla solubilizzazione (peptonificazione) della caseina circostante. Questo alone è tanto più esteso quanto maggiore è l'attività proteolitica del batterio e quanto meno numerose e stipate sono le colonie che si sviluppano su una medesima piastra; ciò per ragioni ovvie di concorrenza vitale. Curioso, però, che la larghezza dell'alone non è sempre proporzionale alla grandezza della colonia; vi sono delle colonie di batteri acidopresamigeni piccole, puntiformi, le quali si circondano di una zona di chiarificazione smisuratamente estesa, assai più estesa di quella che attornia colonie più grandi. Ciò va d'accordo con quanto si rileva talvolta anche nelle culture di siffatti batteri in gelatina, dove si scorgono coloniette, grumetti minutissimi, nuotare in seno a grandi masse di gelatina fusa ⁽¹⁾.

(1) Ved. nel mio lavoro *Sui batteri dei dotti galattofori* il tipo di cocco che designai « a rapida e sproporzionata fusione », in Rend. R. Acc. Lincei, 1902, pag. 162.

* * *

Per questo mezzo delle culture su agarlatte ho potuto accertare l'attività proteolitica in fermenti lattici che nelle culture in gelatina non fluidificavano; non solo, ma ho potuto svelare tale attività in fermenti lattici che non la palesavano nemmeno, o appena dubbiosamente, nelle stesse culture in latte. Tutto ciò sta a provare che la capacità dei fermenti lattici di attaccare la caseina è di constatazione difficile e delicata; essa si mostra tanto legata, non solamente alle condizioni di temperatura e di aerobiosi (come ho dimostrato in altri lavori) ⁽¹⁾ ma altresì alla natura del substrato, che differenze anche minime nella composizione di questo possono impedirne la manifestazione.

Queste differenze minime sono bene spesso inafferrabili, come quelle che si riferiscono alle qualità del latte impiegato per le culture ⁽²⁾. Già *ab origine* i latti possono differire fra loro per ragioni fisiologiche inerenti alle mungane; ancor più lo possono poi per opera degli enzimi e dei germi che, nel lasso di tempo più o meno lungo inter corrente fra la mungitura e l'arrivo in Laboratorio, hanno campo di alterarlo e di elaborarvi vari prodotti eterogenei; in Laboratorio infine l'operazione della sterilizzazione più o meno profonda a cui il latte va soggetto, e la più o meno lunga permanenza del latte allo stato sterile prima di essere coltivato, sono altrettante cause di modificazioni che, in base alle mie osservazioni, appaiono sufficienti a influire sul dispiegamento dell'attività caseolitica da parte dei fermenti lattici.

Ho potuto convincermi di tutto ciò in occasione dei trapianti periodici in latte che da parecchi anni vado facendo dei fermenti lattici della mia collezione. Pur troppo nella maggior parte dei casi ho dovuto limitarmi a constatare il fatto della irregolare comparsa o scomparsa dell'attività caseolitica in un medesimo fermento lattico, e a riconoscere che il fenomeno non poteva dipendere da altro che dalla diversa qualità del latte, senza tuttavia arrivare a dargli ragione precisa, avendo escluso le altre influenze (temperatura, aerobiosi, ecc.).

Ultimamente però le suaccennate culture in agarlatte mi hanno messo sulla via di avanzare un'ipotesi o, meglio, di rintracciare una spiegazione che può attagliarsi a molti casi.

* * *

Come ho fatto conoscere da parecchio tempo ⁽³⁾, una delle sedi abituali di batteri acidopresamigeni, che sono poi fermenti latticocaseolitici, è la mammella

⁽¹⁾ Gorini, C., Bollettino uff. del Min. agricoltura, Roma, 1897. — Annales de micrographie, Parigi, 1897, IX, pag. 433.

⁽²⁾ Gorini C., Rend. R. Ist. lomb. sc. e lett. 1907, XL, pag. 947.

⁽³⁾ Gorini C., Rend. R. Ist. lomb. sc. e lett., 1901, vol. 34, pag. 1279; Rendiconti R. Acc. Lincei, 1902, pag. 162. — Landwirts. Jahrbuch der Schweiz, 1902, pag. 22; Centrabl. f. Bakter., II Abt., 8, 1902; *Revue générale du lait*, 1902.

vaccina, dalla quale essi fuorescono col latte, e segnatamente colle prime stille di latte. Se si prende qualche goccia di questo primo latte e lo si semina per strisciamento su piatte di agarlatte, è ben raro di non assistere allo sviluppo di colonie munite dell'alone caseolitico sopradescritto. Se però queste colonie vengono trapiantate in latte, non sempre (com'è ovvio di intuire da quanto ho esposto indietro) si verifica la conferma dell'attività caseolitica.

Orbene, in alcuni casi di fallita conferma ho provato a riportare la cultura su agarlatte per assicurarne l'identità; con mia sorpresa, notai che il batterio più non si rivelava caseolitico nemmeno sull'agarlatte: che cioè le colonie vi restavano prive di alone caseolitico. Eppure nei rispetti morfologici non c'era dubbio sulla purezza delle culture. Pensai allora d'indagare se nella preparazione dell'agarlatte vi fosse stata qualche modificazione alla quale attribuire il modificato comportamento del batterio; non ne ravvisai altra apprezzabile, all'infuori della qualità del latte adoperato. E per vero, l'agarlatte, che aveva servito alla semina originaria fatta direttamente dalla mammella, era stato allestito col medesimo latte appena munto; invece l'agarlatte delle semine successive era stato allestito con latte commerciale non più certamente fresco e quindi indubbiamente alterato per via enzimatica e microbica. Volli ripetere la prova su agarlatte al latte appena munto; e le colonie di quella medesima cultura ricomparvero coll'alone caratteristico di peptonificazione. Laonde mi parve lecito di supporre che la causa della mancata manifestazione proteolitica stesse in qualche condizione per cui il latte commerciale differisce dal latte appena munto.

Troppe sono le cause che possono far variare i due latti, segnatamente per azione microbica ed enzimatica, perchè io mi proponessi di prenderle in esame singolarmente. Una però ve ne ha, sulla quale parvemi meritasse fermare l'attenzione, perchè mi permetteva di estendere al caso mio una legge fisiologica che è già stata invocata per giustificare la incostanza e perfino la perdita di proprietà funzionali presso altri batteri.

È noto, ad es., che certi azotobatteri cessano dall'assimilare l'azoto libero quando sono coltivati nei laboratori in mezzi troppo nutritivi, talchè, volendo utilizzare culture artificiali di quei microbi per arricchire di nitrogeno il terreno, si è pensato di affamarli, di obbligarli cioè anche nelle culture artificiali a lavorare per procurarsi il cibo azotato. Ora, mi domandai, non potrebbe verificarsi un fatto consimile anche per certi fermenti lattici rispetto alla loro attività proteolitica? Non potrebbe essere che essi siano stimolati a produrre il necessario enzima peptonizzante solamente quando non hanno a disposizione abbondanza di albuminoidi solubili? In tal guisa si comprenderebbe, almeno in parte, la sospensione delle loro manifestazioni caseolitiche in presenza di alcuni latti, considerando che le albumine solubili, naturalmente contenute nel latte, possono variare per ragioni fisiologiche, considerando ancora che esse possono venire più o meno completamente precipitate nel processo di sterilizzazione, considerando altresì che un latte può

arrivare in laboratorio colla caseina già parzialmente solubilizzata da germi peptonizzanti; e via dicendo.

Io ho incontrato latti commerciali dai quali, mediante candela Chamberland, filtrava un siero che dava precipitati non indifferenti con acido fosfovolfamico e con solfato ammonico, mostrando quindi di contenere ragguardevoli quantità di albuminoidi solubilizzati. Simili latti avrebbero potuto ben servire per rispondere al quesito sopraindicato: senonchè, in primo luogo, il quantitativo di albuminoidi disciolti, che può indurre un batterio a risparmiarsi dall'elaborare enzimi proteolitici, non è certamente suscettibile di determinazione; in secondo luogo, un latte commerciale può, per via microbico-enzimatica, aver subito anche altre alterazioni capaci di influire sul comportamento delle culture.

Pertanto, desiderando controllare l'attendibilità della ipotesi avanzata, ho stimato miglior consiglio mettere a raffronto due agarlatti preparati colla medesima qualità di latte appena munto, ad uno dei quali fosse stato aggiunto del peptone secco Witte ⁽¹⁾ nella proporzione di $\frac{1}{4}$ ‰. Facendo culture comparative con diversi tipi di fermenti latticoproteolitici, ho constatato che alcuni di essi, e precisamente quelli a potere caseolitico incostante, nell'agarlatte semplice davano colonie piccole ma alonate, mentre nell'agarlattepeptone davano colonie prive di alone caseolitico sebbene meglio sviluppate. Resta così provato che *il contenuto di albuminoidi solubili (peptoni) in un latte è da ritenere altra delle cause per cui un fermento lattico non manifesta le proprie attività caseolitiche.*

Se ora riflettiamo all'altro fatto, da me pure messo in luce, di fermenti latticoproteolitici che nelle culture in gelatina si sviluppano senza fonderla, mentre poi l'enzima caseolitico da essi prodotto nelle latte-culture esercita azione fluidificante sulla gelatina stessa, sembrami logico di ammettere che la presenza di peptone nella gelatina nutritiva sia la causa della mancata elaborazione di enzima proteolitico da parte delle colonie ivi sviluppatasi. Disgraziatamente qui non sarebbe indicato di istituire culture comparative su gelatina con e senza peptone, perchè la gelatina semplice senza aggiunta di albuminoidi solubili non è materiale nutritivo sufficiente per i fermenti lattici, come del resto per la pluralità dei batteri.

* * *

RIASSUNTO E DEDUZIONI. — Riassumendo, adunque, la presente Nota reca un nuovo contributo alla dimostrazione, da me già data in precedenti

⁽¹⁾ Ho specificato la qualità di peptone adoperato, perchè data la grande variabilità dei peptoni che vanno sul commercio, è possibile che con altri peptoni si ottengano risultati differenti. Circa l'influenza della qualità del peptone sul biochimismo dei batteri vedasi il mio lavoro pubblicato nel 1893 sul « Giornale della R. Società Italiana d'Igiene », anno XV, n. 5.

lavori, circa la *influenza del substrato sull'attività proteolitica dei fermenti lattici*.

Quest'influenza si rivela in modo manifesto *confrontando il comportamento di certi fermenti lattici nelle culture in gelatina e nelle culture in latte*, in quanto essi, mentre peptonificano il latte, non arrivano a fluidificare la gelatina, sebbene d'altra parte gli enzimi caseolitici da essi elaborati in latte si dimostrino atti a peptonizzare la gelatina.

Ma l'influenza del substrato è così sensibile che si rivela *puranco confrontando il comportamento di uno stesso fermento lattico di fronte a diverse qualità di latte*, sia coltivandolo nel latte liquido tal quale, sia coltivandolo nel latte reso solido con agar (agarlatte). Onde ne deriva che l'azione caseolitica di certi fermenti lattici appare incostante per cause per lo più imprecisabili e dipendenti verosimilmente dalle alterazioni subite dal latte prima, durante o dopo la sua sterilizzazione in laboratorio.

Fra le cause che valgono a spiegare l'incostanza dell'attività caseolitica dei fermenti lattici va annoverato il *contenuto in albuminoidi solubili (peptone) del latte*, massime del latte commerciale. Per analogia è lecito di inferire che la mancata fluidificazione della gelatina nutritiva da parte di certi fermenti latticocaseolitici debba ascriversi agli albuminoidi solubili (peptone) in essa contenuti.

Ciò guida alla supposizione che presso certi fermenti lattici lo stimolo a produrre enzimi proteolitici sia subordinato al bisogno di procurarsi dell'azoto solubile per il proprio sostentamento; quando essi trovano quest'azoto solubile in quantità sufficiente e già bell'e pronto nel substrato, potrebbero esimersi dal secernere l'enzima solubilizzante.

Comunque sia, resta accertato, dalle mie ricerche precedenti e dalle attuali, che per giudicare della capacità proteolitica di un fermento lattico non sono criteri sufficienti le culture in gelatina e nemmeno le culture in qualunque sorta di latte; bisogna sperimentare variando le qualità di latte e tenendo conto particolarmente delle differenze che possono intercorrere fra i latti freschi appena munti e i latti commerciali, massime nei riguardi del contenuto in albuminoidi solubili (peptone), per cause microbiche ed enzimatiche.

Ed ora, se sommiamo quello che ho esposto nella presente Nota circa l'influenza del substrato, con quello che ho esposto nella Nota precedente ⁽¹⁾ circa l'influenza della temperatura sulle manifestazioni proteolitiche dei fermenti lattici, vediamo come occorra procedere guardinghi prima di escludere che un fermento lattico sia capace di peptonizzare la caseina in ambiente acido, e come sia lecito di presumere che tale capacità (da me primamente messa in luce) sia più diffusa di quanto indurrebbero a ritenere gli autori che delle suddette influenze non si sono preoccupati.

⁽¹⁾ Gorini C., Rend. R. Acc. Lincei, 1915, 24°, pag. 369.