

Misc. A. 40.24

All' Ill.^{mo} Prof. G. Arco
omaggio dell' A.



LA PROTEOLISI

NEGLI

SCHIZOMICETI E IFOMICETI

PEL

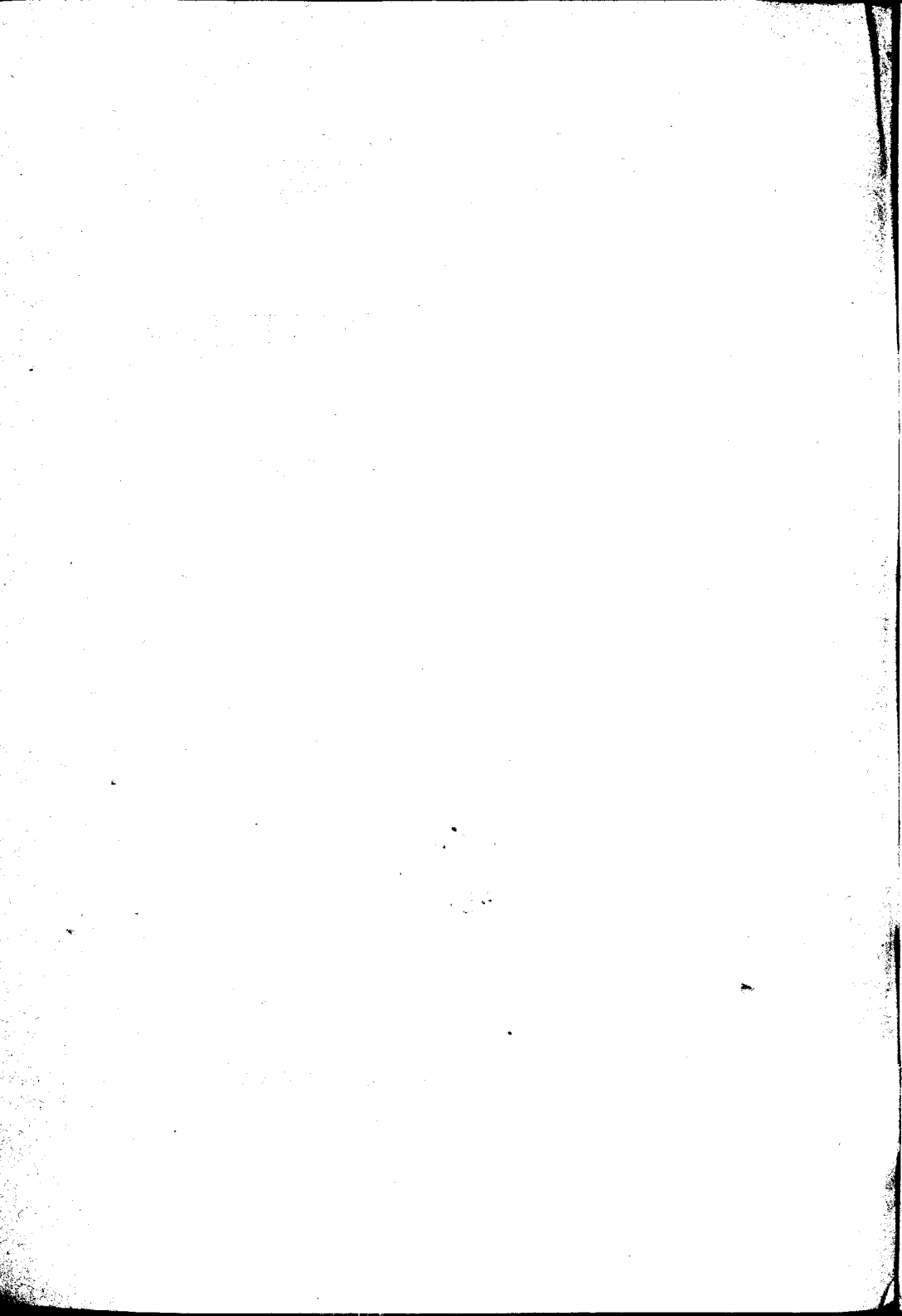
Dott. CARLO TIRABOSCHI



== MILANO ==

INDUSTRIA GRAFICA ITALIANA STUCCHI CERETTI e C.

— 1908 —

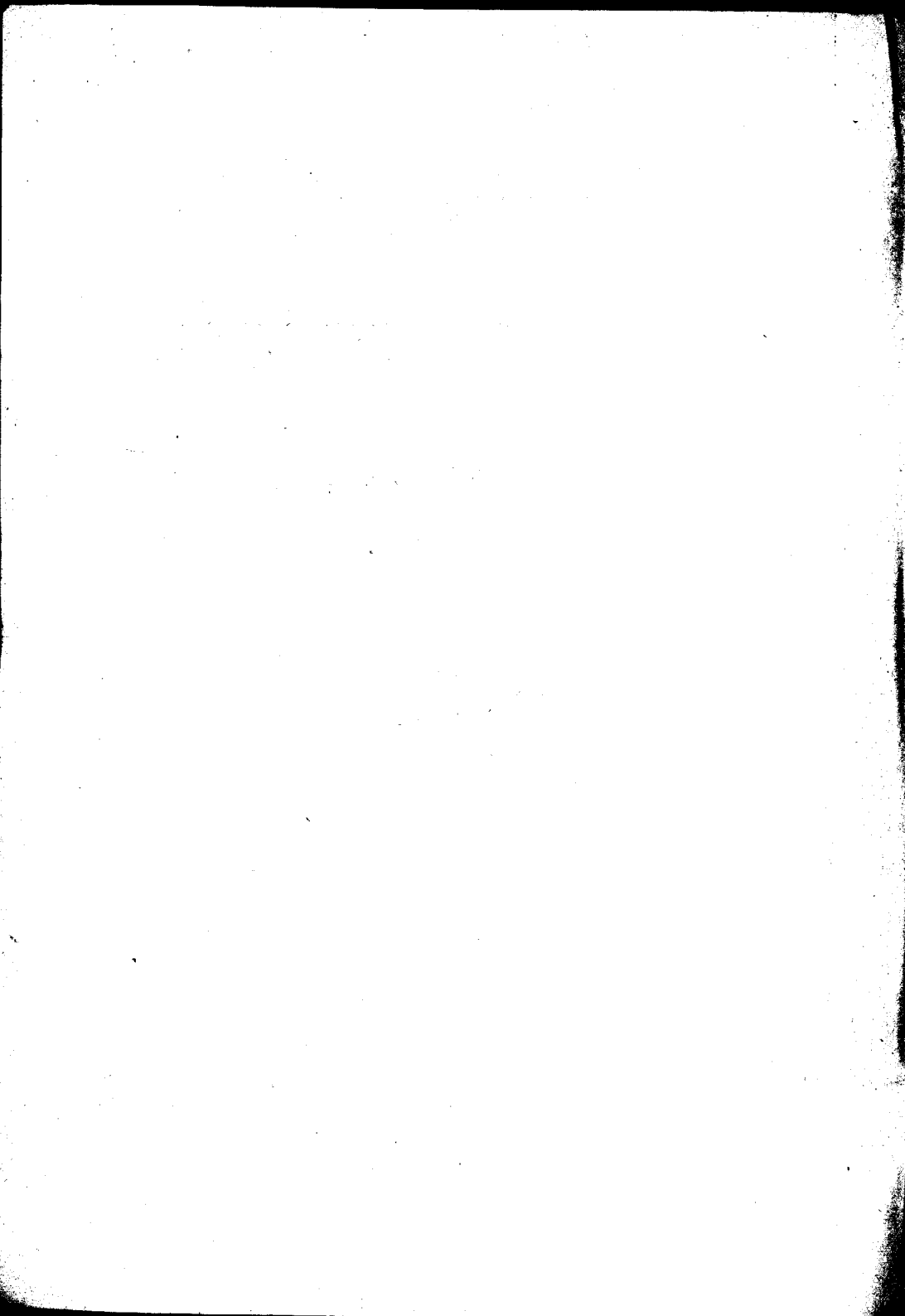


LA PROTEOLISI
NEGLI
SCHIZOMICETI E IFOMICETI

PEL
Dott. CARLO TIRABOSCHI



— MILANO —
INDUSTRIA GRAFICA ITALIANA STUCCHI CERETTI E C.
— 1908 —



In un altro mio lavoro (XXX) ho esposto i risultati delle mie esperienze sull'azione che la formaldeide esercita sopra la gelatina fluidificata dagli Schizomiceti e dagli Ifomiceti e sono venuto alla conclusione che i 25 germi fluidificanti la gelatina, che io avevo presi in esame, erano tutti capaci di trasformare la gelatina in un prodotto non più solidificabile dalla formaldeide, pur presentando delle differenze rispetto alla rapidità con la quale, in determinate condizioni di temperatura, substrato nutritivo etc., essi riuscivano a compiere tale trasformazione. Ritenevo quindi di non poter confermare la ripartizione, proposta da Mavrojannis, dei batteri liquefacenti in due categorie, gli uni capaci di trasformare la gelatina soltanto in gelatosi (solidificabile dal formolo) e gli altri capaci di spingerne la trasformazione almeno fino al grado di peptone (non risolidificabile dalla formalina).

Il Mavrojannis in una sua lettera dice che i risultati delle mie esperienze non gli sembrano così discordanti da quelli delle sue, come parrebbe dalla lettura delle mie conclusioni, cita i casi in cui io stesso ho constatato la risolidificazione di gelatina completamente fluidificata da 15 giorni e osserva che la conclusione che si può dedurre dalle mie osservazioni è la seguente: la gelatina fluidificata da un germe liquefaciente, talora è solidificabile dal formolo, talora no; un germe liquefaciente la gelatina produce dunque due specie di enzimi fluidificanti, uno che dà dei prodotti risolidificabili dalla formaldeide, l'altro che dà dei prodotti su cui la formaldeide resta senza azione. Il Mavrojannis dice che il punto fondamentale delle sue osservazioni non è già la divisione dei germi fluidificanti la gelatina in due classi, ma bensì la distinzione di due categorie diverse di enzimi fluidificanti e aggiunge che le mie esperienze non infirmano affatto questo modo di vedere, ma anzi lo confermano.

Azione della formaldeide sulla gelatina fluidificata dai batteri e dalle muffe.

Due gelatinasi diverse?

Mi sia lecito ricordare che il punto fondamentale delle conclusioni del Mavrojannis è appunto la ripartizione dei germi fluidificanti la gelatina in due gruppi, al primo dei quali appartarrebbero *Staphylococcus pyogenes aureus*, e *albus*, *Bacillus anthracis*, *B. pyocyaneus* e *Vibrio cholerae*, al secondo i vibroni di Deneke, di Finkler-Prior e di Metchni-koff. Ed è appunto riguardo a questa distribuzione, e per questa soltanto, che le conclusioni dedotte dalle mie esperienze non collimavano con quelle di Mavrojannis. Quanto all'altra affermazione della esistenza di due specie diverse di enzimi gelatinolitici, essa, come dirò in seguito, non era che una deduzione del punto fondamentale stabilito dal Mavrojannis; per conto mio, nè la affermavo nè la negavo, perchè non avevo elementi nè per sostenerla nè per infirmarla; non posso neppure ora, anzi, accettare l'osservazione del Mavrojannis, che i risultati delle mie esperienze confermino il suo modo di vedere.

L'unica deduzione rigorosamente logica che si può trarre dai risultati delle mie esperienze è questa: un germe fluidificante la gelatina la trasforma dapprima in un prodotto risolidificabile dai vapori di formalina e poi in un prodotto non più risolidificabile; la rapidità con cui un germe compie queste due trasformazioni successive è diversa per i diversi germi fluidificanti ed è inoltre variabile, per un dato germe, a seconda del campione e della provenienza del germe e a seconda delle condizioni di temperatura, di substrato nutritivo etc., e in genere di tutte quelle condizioni che possono influire sullo sviluppo del germe e sulla produzione, per parte di esso, dell'enzima proteolitico (1).

Io non affermavo, nè, ripeto, avevo elementi per affer-

(1) È noto però che non sempre il grado di attitudine a produrre enzimi è strettamente coordinato a quello di vitalità o di sviluppo del germe; vi sono infatti delle sostanze che impediscono completamente la produzione dell'enzima proteolitico da parte di alcune specie microbiche fluidificanti la gelatina, pur senza ostacolare affatto lo sviluppo vegetativo; ricorderò fra queste sostanze la stricnina e l'antipirina che alla dose del 5‰ ostacolano la produzione della proteasi del *Bacillus prodigiosus* etc. D'altra parte, come vedremo meglio in seguito, la temperatura, la composizione e reazione del terreno nutritivo a base di gelatina e molte altre condizioni influiscono non soltanto sullo sviluppo del germe ma anche sulla intensità d'azione dello stesso enzima gelatinolitico. Ricorderò infine che quando parlo di condizioni che influiscono sulla produzione, da parte dei batteri o delle muffe, dell'enzima proteolitico, non intendo affatto parlare di influenza diretta di queste condizioni sulla produzione della proteasi, ma solo di un'influenza indiretta; ed è naturale che questa influenza indiretta sia esercitata da tutte quelle condizioni che influiscono direttamente sullo sviluppo dei germi; col crescere degli individui eccerenti un dato enzima è naturale che cresca la quantità totale dell'enzima prodotto in una coltura. Di questa opinione è anche Malfitano, per quanto almeno riguarda la gelatinasi dell'*Aspergillus niger*; io però non escludo, come pare voglia fare Malfitano, che alcune condizioni esterne possano talvolta influire direttamente sulla produzione dell'enzima: per alcuni germi infatti io avrei trovato che la temperatura *optimum* per la gelatinolisi non coincide con quella *optimum* per lo sviluppo; ad es. il *Bacillus anthracis* fluidifica più rapidamente la gelatina nelle colture a 22° che in quelle a 37° C. e pare anzi che a 26° produca una proteasi più abbondante o più attiva che a 37°.

mare, che si trattasse di due trasformazioni distinte (o di due serie distinte di trasformazioni) sostenute da due enzimi diversi, oppure di una progressiva trasformazione compiuta da un enzima unico; inclinavo però più per questa seconda interpretazione che non per la prima, e ciò sia in base ai risultati delle mie esperienze, sia, e ancora più, in base a quelli di Mavrojannis.

Infatti io avevo constatato che con tutti indistintamente i germi fluidificanti la gelatina che io avevo presi in esame (18 Schizomiceti e 7 Ifomiceti), sia che la fluidificassero lentamente o rapidamente, sia che lentamente o rapidamente la trasformino in un prodotto non più solidificabile dalla formaldeide, sia che venissero coltivati alla temperatura *optimum* di sviluppo o ad una temperatura da questa molto lontana e vicinissima invece al *minimum*, in tutti i casi la gelatina fluidificata era, in un primo tempo, solidificabile dal formolo e poi perdeva questa proprietà. L'interpretazione che mi parve più plausibile fu quindi quella che si trattasse, per un dato germe, di un unico enzima, il quale determinasse una progressiva scomposizione della molecola della gelatina e che questa scomposizione progressiva si compiesse tanto più rapidamente quanto più attivo o quanto più abbondante fosse l'enzima prodotto dal germe, e ciò in rapporto da una parte con la specie e provenienza del germe, dall'altra con le condizioni sue di sviluppo. In questa progressiva scomposizione la molecola della gelatina, passando per lo stadio di gelatosi (proto e deutero-gelatosi), finisce per trasformarsi in peptone di gelatina e forse più oltre (1). Se questa duplice serie di trasformazione fosse sostenuta, come vuole il Mavrojannis, da due enzimi specifici diversi, ci sarebbe da attendersi che mentre in alcuni germi fluidificanti la gelatina esisterebbero tutti e due questi enzimi, in altri si produrrebbe soltanto il primo (gelatinasi A di Mavrojannis) e così come si ha la ripartizione dei germi in germi fluidificanti la gelatina e in germi non fluidificanti la gelatina, si avrebbe una ripartizione dei primi in germi fluidificanti e peptonizzanti la gelatina e in germi semplicemente fluidificanti e non peptonizzanti la gelatina. A questa conclusione infatti è venuto il Mavrojannis e da essa ha logicamente dedotto l'esistenza di due enzimi specifici diversi: siccome io ho dimostrato che la ripartizione proposta dal Mavrojannis non si può accettare o che almeno essa non sussiste per i germi da lui e da me esaminati, così la deduzione che egli ne ha tratta non ha più ragion d'essere.

Nel *Biochemisches Centralblatt*, Vol. IV, pag. 268, trovo citato un lavoro di Charasow (V), pubblicato in russo e di cui non ho potuto avere e consultare l'originale; ma dalla recensione di Krüger rilevo che anche il Charasow, il quale ha sperimentato con gli stessi germi studiati dal Mavrojan-

Una sola gelatinasi.

Ricerche di altri autori.

(1) Quali siano precisamente le sostanze che si formano dopo la trasformazione in peptone è ancora oggi molto discusso.

nis (*Vibrio cholerae*, *B. pyocyaneus*, *B. anthracis*, *St. pyogenes aureus* e vibriani colerasimili), ha trovato che questi microrganismi trasformano tutti la gelatina in peptone, e che solo è diverso il tempo da essi impiegato per compiere tale trasformazione. Di un altro lavoro pubblicato da Bogoluboff (III) nello stesso periodico russo trovo un accenno nel *Bulletin de l'Institut Pasteur*, Vol. V., pag. 429; questo A. ha studiato 17 stafilococchi fluidificanti la gelatina e ha trovato che il grado di fluidificazione della gelatina dipende dalle condizioni in cui si opera; in condizioni favorevoli la gelatina è il più delle volte trasformata in peptone e non è risolidificata dai vapori di formalina; se le colture invece si fanno a temperatura ambiente, la gelatina è risolidificata dalla formaldeide. Conclude l'A. che gli enzimi elaborati dai diversi stafilococchi sono gli stessi e che differiscono solo per intensità di fluidificazione.

Una conferma della interpretazione da me data ai risultati delle mie esperienze mi parve trovarla negli esperimenti eseguiti dal Mavrojannis con la pancreatina e con la papaina. Quanto alla pancreatina, è noto che essa contiene, oltre a della albumina e a della caseina, almeno tre enzimi diversi: uno amilolitico (diastasi pancreatica), uno steatolitico (steapsina) e uno proteolitico (tripsina); è appunto quest'ultimo fermento (che alcuni chiamano anche erroneamente col nome di pancreatina) quello che ha azione sulla gelatina e ne determina la fluidificazione. Quanto alla papaina (o papaiotina), estraibile dal succo di una pianta (*Carica papaya*), essa sarebbe un enzima unico, ad azione esclusivamente proteolitica. Il Mavrojannis, sottoponendo la gelatina all'azione della pancreatina (=tripsina?) e della papaina, ha visto che in un primo tempo la gelatina è fluidificata e trasformabile in prodotti (proto-e deutero-gelatosi) solidificabili dalla formaldeide (1), ma che poi, più rapidamente per quanto riguarda la pancreatina, più lentamente per quanto si riferisce alla papaina, la gelatina è ridotta ad una sostanza (gelatina-peptone), su cui il formolo non esercita alcuna azione solidificante.

Per quanto la papaina e più ancora la tripsina non siano sostanze di composizione chimica ben determinata e quindi si possa sempre dubitare che nella sostanza che va sotto il nome di papaina e più ancora in quella che va sotto il nome di tripsina (2) si possano trovare riuniti due o più proteasi diverse, pure *l'ipotesi più verosimile è, fino a prova contraria, che si tratti di una proteasi unica che agisce sulla molecola della gelatina scomponendola progressivamente in una*

(1) Secondo Mavrojannis non solo la protogelatosi, ma anche la deutogelatosi (benchè più lentamente) è risolidificata dalla formalina; secondo Malitiano invece (XIX) la formaldeide rende insolubile soltanto i primi termini della digestione fino alla protogelatosi e non oltre.

(2) La purezza di queste sostanze dipende naturalmente anche dal modo col quale sono state preparate; così p. es. Fermi (IX) ha trovato che la tripsina di Grùbler è molto più attiva di quella di Merk.

o più serie di prodotti, di cui forse le gelatosi e i peptoni non sono che dei termini. Ad ogni modo non è dimostrato, nè per la tripsina nè per la papaina, che esse contengano due o più specie diverse di proteasi (1) e tanto meno questo è dimostrato per gli enzimi proteolitici dei batteri, delle muffe, dei blastomiceti etc.

La differenza fra le esperienze istituite con gli Schizomiceti o con gli Ifomiceti, Blastomiceti, etc. e con la tripsina o la papaina sta in questo: nel secondo caso si mette direttamente la gelatina a contatto con l'enzima proteolitico e questo quindi esplica rapidamente (2) la sua azione, mentre nel primo caso bisogna dar tempo al germe in esame di moltiplicarsi e di segregare una sufficiente quantità di gelatinasi (3). La diversa rapidità di fluidificazione per opera dei diversi germi può dipendere o dalla diversa quantità o dalla diversa qualità della proteasi da essi eliminata; potrebbe darsi infatti che i diversi germi producessero proteasi diverse.

È noto p. es. che la proteasi dello *Staphylococcus pyogenes aureus*, del *Bacillus prodigiosus* etc. è distrutta a 55° C. (in un'ora), mentre quella del vibrione di Finkler-Prior, del bacillo di Kieler etc. è distrutta solo a 70° C. (4). Diversa è

Proteasi batteriche
diverse?

(1) Se infatti si volesse supporre che ogni scomposizione molecolare sia determinata da uno speciale enzima, siccome le scomposizioni qui viene sottoposta la molecola della gelatina sono molte, bisognerebbe supporre l'intervento di molte gelatinasi diverse.

(2) Naturalmente la rapidità di azione dell'enzima dipende dalla quantità di esso che si fa agire e dalle condizioni in cui si fa agire. Così il Mavrogiannis (XXI) che faceva agire, a 40°, gr. 1 di tripsina mischiata intimamente con cmc. 100 di gelatina al 10 0/0, ne otteneva la completa peptonizzazione in 9-10 ore; Fermi (IX) che usava tripsina in soluzioni diluitissime (10/100 fino a 1:1.000.000) e la faceva agire a temperature più basse e semplicemente a contatto della gelatina solida, osservava che la gelatinolisi si compiva lentissimamente, in giorni e anche in mesi. Malfitano (XIX) ha trovato, per la gelatinasi dell'*Aspergillus niger*, mischiata alla gelatina, che il tempo nel quale si compie la fluidificazione varia, a parità di condizioni, in ragione inversa della quantità di enzima adoperato.

(3) Che anche le proteasi di origine batterica etc., poste direttamente a contatto con la gelatina, la fluidifichino più rapidamente di quello che facciano le rispettive colture, è stato sperimentalmente dimostrato da Malfitano (XIX) per l'*Aspergillus niger* e da me (XXX) per l'*Actinomyces bovis*. E che le proteasi di origine batterica agiscano indipendentemente dalla presenza di cellule batteriche viventi, era già stato dimostrato per la prima volta, nel 1886, da Bitter (II), il quale trovò ancora fortemente attiva sulla gelatina e sulla fibrina una coltura di *Vibrio cholerae* uccisa a 60° per 1½ ora. Rietsch e Sternberg dimostrarono la presenza di enzimi proteolitici nelle colture di colera e di altri germi liquefacenti la gelatina. Hansen (1889) (XIV) estrasse con glicerina dalle patine culturali di *Penicillium glaucum* un fermento gelatinolitico, ma non riuscì a precipitarlo con alcool (il precipitato che otteneva non era attivo). Fermi (1890) (VI) riuscì ad isolare in uno stato di relativa purezza, precipitando con alcool assoluto, le proteasi di parecchi germi genalinolitici e trovò che la più attiva era quella del vibrione di Finkler-Prior. Similmente Malfitano (1900) (XIX) isolò la proteasi dell'*Aspergillus niger*. Io, per studiare l'azione delle proteasi indipendentemente dalla presenza dei germi che le producono, mi sono limitato a filtrare attraverso a candele Berkefeld e Chamberland le colture di questi germi (vedi appresso).

(4) Queste temperature vanno intese quali temperature alle quali si portano le soluzioni acquose (più o meno impure) di detti enzimi; in tali

anche la resistenza (delle proteasi di origine batterica diversa) agli acidi, alla formaldeide, alla luce etc.; diversi sono i limiti di temperatura nei quali queste diverse proteasi agiscono e diverso l'*optimum* di temperatura; diversa è l'attività di queste diverse proteasi sui diversi albuminoidi, come accenneremo tra poco; diversa infine è l'attività gelatinolitica che queste diverse proteasi manifestano in un determinato ambiente; anzi, secondo Malfitano (XIX), il carattere distintivo principale di un enzima « consiste dans sa manière de se comporter vis-a-vis de la réaction du milieu; sa physionomie est donnée par le degré de réaction la plus favorable à son activité ». *Ma da tutte queste diversità di comportamento riscontrate nelle proteasi di origine batterica diversa non è lecito dedurre in modo perentorio che si tratti di proteasi realmente diverse per natura e per composizione.* Per addivenire a questa conclusione sarebbe necessario sperimentare con enzimi allo stato di assoluta purezza, (risultato non ancora conseguito non ostante tutti i numerosi tentativi fatti), giacchè è noto che la presenza di alcune sostanze, anche in piccolissima quantità, influisce fortemente non solo sulla attività degli enzimi ma anche sulla resistenza che gli enzimi stessi oppongono alla azione distruttrice operata da alcuni reagenti, ad es. dal calore. Io stesso ho dimostrato (XXXI) come l'aggiunta di piccolissime quantità di Na Cl renda molto più rapida e più intensa la gelatinolisi prodotta dalla proteasi del *Vibrio cholerae*, *Aspergillus effusus* etc. e come attenui fortissimamente l'azione ostacolante che la formaldeide esercita su queste proteasi e specialmente su quella del colera. Per quanto riguarda l'azione distruttrice del calore, ricorderò che le differenze riscontrate per le proteasi dei diversi batteri si sono attenuate sempre più col crescere della purezza delle soluzioni enzimatiche adoperate.

Gelatinolisi e proteolisi.

Comunque sia, da quanto ho detto sin qui risulta che *non bisogna confondere, come invece comunemente si fa, fluidificazione e peptonizzazione della gelatina*; la gelatina può essere fluidificata da un enzima proteolitico senza che essa sia ancora, almeno nella sua massima parte, peptonizzata; essa infatti sarebbe già fluidificata quando ancora si trova allo stadio di gelatosi. D'altra parte non bisogna credere che la trasformazione in peptone si inizi solo quando tutta la massa della gelatina è stata già trasformata in gelatosi. Tutte queste trasformazioni o queste serie di trasformazioni si compiono contemporaneamente in uno stesso tubo di coltura, come si può constatare con quei germi o con quei campioni di germi che fluidificano molto lentamente la gelatina, cosicchè bisogna lasciar trascorrere uno o due mesi prima che la gelatina sia tutta disciolta, anche se le provette vengano

condizioni nessuna delle proteasi di origine batterica finora sperimentate resisterebbe a 70°. Io però ho trovato che la proteasi contenuta nel filtrato di brodculture di carbonchio resiste anche a 80° per 12 ora. Invece al calor secco alcune proteasi, p. es. quella del vibrione di Finkler e Prior, resistono per 10' a 120°-140°.

spesso agitate. Se dopo un giorno soltanto che si è effettuata la fluidificazione totale, si espone la gelatina ai vapori di formalina, questi spesso non la risolidificano, segno che mano a mano che progrediva la fluidificazione della gelatina, la gelatina fluidificata e trasformata in gelatosi veniva attaccata e trasformata in peptone; per spiegare questo fatto non è necessario ammettere l'intervento di due o più enzimi diversi.

Per brevità, nel corso di questo lavoro io adoprerò la parola fluidificazione per indicare il fenomeno della semplice fluidificazione, cioè la trasformazione della gelatina in un prodotto, liquido anche a temperature inferiori ai 20° C., ma risolidificabile dai vapori di formalina (gelatosi, secondo Mavrojannis); per indicare invece il fenomeno della trasformazione in un prodotto non più solidificabile della formaldeide (peptone, secondo Mavrojannis), userò la parola peptonizzazione, la quale parola quindi può comprendere delle trasformazioni ancora più avanzate della vera e propria peptonizzazione o trasformazione in peptone. Inoltre quando io parlo di fluidificazione e di peptonizzazione, e in genere anche quando parlo di proteolisi, intendo sempre limitarmi alla gelatinolisi. E' noto infatti che alcuni albuminoidi, ad es. la fibrina, non sono attaccati dalle proteasi in genere e da quelle batteriche in specie così facilmente come la gelatina; molte proteasi batteriche capaci di fluidificare la gelatina sono inattive sulla fibrina o perdono più facilmente la facoltà di peptonizzare questo albuminoide. De Waele e Vandeveld (VI), che hanno studiato l'azione proteolitica, a 37° C., di batteri diversi (*Bacillus pyocyaneus*, *B. enteritidis*, *B. anthracis*, *B. megatherium* e *Vibrio cholerae*) sulla gelatina e sulla caseina, han trovato che queste due azioni procedono, per uno stesso germe, di pari passo; i microbi che fluidificano fortemente la gelatina sono precisamente quelli che disciolgono energicamente la caseina; secondo gli A.A. questo parallelismo sembrerebbe indicare che le due trasformazioni sono dovute ad un unico fermento. Per quel che si riferisce agli Ifomiceti, ricorderò che secondo Malfitano (XIX) la proteasi dell'*Aspergillus niger* non attacca affatto nè l'albumina d'uovo coagulata dal calore, nè la fibrina cotta; poco sensibile è pure la sua azione sull'ovalbumina in soluzione, più rilevante invece quella sulla fibrina, sulla seralbumina e sulla caseina, per quanto sia sempre inferiore a quella sulla gelatina. Per quanto infine riguarda gli enzimi di origine non batterica nè ifomicetica dirò che secondo Fermi (IX) la gelatina è, all'azione della tripsina, molto più sensibile non solo della fibrina, ma anche, e anzi in misura molto maggiore, della caseina, dell'ovalbumina coagulata, etc.

*
* *

Quando scrissi il mio lavoro sulla fluidificazione della gelatina non avevo avuto conoscenza di una pubblicazione del Mavrojannis (XXI), successiva a quella da me presa in considerazione, e concernente il *Vibrio cholerae* e tre altri vibrioni:

*La gelatinolisi del
vibrione del colera.*

vibrione di Deneke, di Finkler-Prior e di Metchnikoff. Già nel primo suo lavoro del 1903 il Mavrojanis aveva collocato il vibrione colerigeno nella 1^a categoria (germi capaci di fluidificare la gelatina, ma incapaci di peptonizzarla) e gli altri tre vibroni nella 2^a (germi capaci di peptonizzare la gelatina). Nel lavoro pubblicato nel 1904 egli riafferma che il vibrione di Koch è capace di dare soltanto della gelatosi e non del peptone e aggiunge che il formolo può quindi servire come un mezzo prezioso per la diagnosi differenziale del vibrione colerigeno da vibroni affini; egli stesso però fa osservare che questo mezzo diagnostico, richiedendo molti giorni per la sua applicazione, non può essere impiegato che per ricerche di laboratorio. Inoltre sarebbe stato opportuno, prima di enunciare questa proprietà differenziale del vibrione di Koch, sperimentare con molti altri vibroni, oltre che con i tre esaminati da Mavrojanis.

Mie ricerche precedenti.

Nel mio precedente lavoro (XXX) io ho già riferito che avendo coltivato (sulla comune gelatina nutritiva e anche su quella preparata secondo le prescrizioni di Abba per l'analisi batteriologica delle acque potabili) cinque campioni diversi di *Vibrio cholerae* alla temperatura di circa 20° C., tutti e cinque questi campioni riuscirono a peptonizzare la gelatina in un tempo relativamente breve; intatti la gelatina di una comune provetta, trovata tutta fluidificata dopo 15 giorni ed esposta ai vapori di formalina dopo altri 15 giorni, non si risolidificò mai, neppure quando l'azione della formaldeide venne prolungata per due o tre mesi (1). Gli stessi risultati ottenni con cinque differenti specie di vibroni acquatili. La lettura della seconda pubblicazione del Mavrojanis e il fatto di avere a mia disposizione un sesto campione di vibrione colerigeno (isolato in Germania nella epidemia del 1905) e altri vibroni non colerigeni (il vibrione di Massaua, quello di Metchnikoff, il *Vibrio danubicus* e un vibrione di specie non determinata, isolato dall'acqua) mi indussero a ripetere le mie esperienze per controllarle e per vedere di trovare la causa dei risultati diversi ottenuti da me e da Mavrojanis.

Nuove ricerche.

Col *Vibrio cholerae* 6° stipite feci molte serie di esperienze, coltivandolo a 37°, a 24°, a 20° e a 16°-17° C.; in tutte le serie di queste culture potei sempre ottenere non solo la totale fluidificazione ma anche la peptonizzazione della gelatina.

Come già avevo potuto constatare nelle mie precedenti esperienze, la fluidificazione e la peptonizzazione si effettuarono molto più rapidamente nelle colture a 37° che in quelle a 20°-24° e più rapidamente in queste che in quelle a 16°-17° C.

Per quanto riguarda le colture a 37° C., la constatazione della avvenuta completa fluidificazione veniva fatta immergendo per mezz'ora circa la provetta in ghiaccio fondente (2);

(1) Anche il Charasow che ho citato più sopra ha trovato che il *Vibrio cholerae* è capace di trasformare la gelatina in peptone, non risolidificabile dalla formaldeide.

(2) Nelle precedenti esperienze prendeva come data della effettivata completa fluidificazione, talvolta quella in cui la gelatina non si risolidi-

già dopo 56 ore in una prima serie, dopo 40 in una seconda e dopo 30 in una terza potei constatare che la gelatina era stata completamente fluidificata dalla gelatinasi prodotta dai vibrioni rigogliosamente sviluppatisi; essa infatti si manteneva perfettamente fluida anche a 0° C. Le colture furono allora lasciate a 37° C.: per altre 16 ore quelle della prima serie, per quattro giorni quelle della seconda, e per due e per sei giorni quelle della terza e poi furono esposte ai vapori di formalina, secondo il procedimento già da me descritto nel precedente mio lavoro. In tutti i casi la gelatina non tornò mai solida, neppure dopo due mesi di azione della formaldeide. Il *Vibrio cholerae* coltivato a 37° era quindi stato capace di fluidificare la gelatina in meno di 30 ore e di peptonizzarla in tre giorni soltanto.

Nelle colture a 24° C. la fluidificazione totale della gelatina si verificò: in 7-8 giorni soltanto nelle provette di una prima serie e in 10-11 giorni in quelle di una seconda serie; in tutti e due i casi fu constatato che la gelatina rimaneva perfettamente fluida anche a 0° C. Delle provette della prima serie, alcune furono senz'altro esposte ai vapori di formalina (e in queste la gelatina tornò solida dopo 25-30 giorni), altre invece furono prima lasciate a 24° C. per due o tre giorni ancora (e in queste poi la gelatina tornò solida dopo 20-25 giorni) o per sei o sette giorni (e in queste la gelatina era ancora fluida dopo più di due mesi); di quelle della seconda serie, alcune furono esposte ai vapori di formalina dopo un giorno (e in queste la gelatina tornò solida dopo 35-50 giorni), altre dopo tre o quattro giorni (e in queste la gelatina restò fluida). Il *Vibrio cholerae* coltivato a 24° C. era quindi stato capace di fluidificare in 7 giorni tutta la gelatina contenuta in una ordinaria provetta e di peptonizzarla in 15 giorni e forse anche in meno.

Nelle colture a 20° C. la gelatina era completamente fluidificata dopo 9-10 giorni e si manteneva fluida anche a 0°; esposta ai vapori di formalina dopo altri 2-6-10 giorni essa non fu mai risolidificata; a 20° C. dunque la fluidificazione si era compiuta in 9-10 giorni e la peptonizzazione in 11-12 giorni soltanto.

Infine nelle colture a 16°-17° C. la fluidificazione fu molto più lenta, giacchè essa era totale dopo quasi un mese in alcune provette e dopo poco più di un mese in altre; la gelatina delle prime fu esposta ai vapori di formalina dopo sei giorni e quella delle seconde dopo 10 giorni; in un caso e nell'altro essa si mantenne fluida. Il *Vibrio cholerae* coltivato a 16°-17° C. era stato capace di peptonizzare la gelatina in 35 giorni e forse anche in meno.

Dai risultati di queste esperienze, confrontati fra loro, si deduce che *sul fenomeno della fluidificazione e peptonizzazione* *Influenza della temperatura.*

ficava a 0°, tal'altra quella in cui la gelatina non tornava solida a 10° circa; evidentemente, per potere istituire dei confronti, bisogna riferirsi sempre alla stessa temperatura, come dirò meglio in seguito; per comodità ho scelto la temperatura del ghiaccio fondente.

zione della gelatina esercita una grande influenza la temperatura alla quale il germe viene coltivato. Io ho già rilevata l'importanza di questo fattore nel mio precedente lavoro, dove dicevo che il *Bacillus pyocyaneus*, lo *Staphilococcus pyogenes citreus* e il *Vibrio cholerae* fluidificano e peptonizzano la gelatina più rapidamente a 37° che a 22°, mentre il contrario parrebbe che si verificasse per il *Bacillus anthracis* (1). Dalle nuove esperienze risulta che per il *Vibrio cholerae* la rapidità di fluidificazione e peptonizzazione è presso a poco la stessa a 24° e a 20°; da alcune di esse parrebbe anzi che a 20° la peptonizzazione si compisse più rapidamente che a 24° C.; infatti la gelatina delle colture a 20° C., sottoposta all'azione della formaldeide dopo 11-12 giorni soltanto dalla semina, non si è risolidificata, mentre quella delle colture a 24° C., esposta ai vapori di formalina dopo 11 giorni, è stata da essi risolidificata.

Altri fattori.

Bisogna però tener presente che oltre alla temperatura molti altri fattori intervengono a modificare il fenomeno, primo fra tutti quello della provenienza e forse della virulenza del germe, di cui ora parleremo, poi quello della composizione e della reazione del terreno a base di gelatina, del quale fattore pure discuteremo ampiamente in seguito, poi quello rappresentato dal complesso di condizioni che influiscono sullo sviluppo del germe e quindi anche sulla produzione di proteasi; di più il tempo nel quale si compie la fluidificazione totale della gelatina dipende naturalmente dall'altezza dello stato di gelatina nella provetta di coltura; ora io ho procurato che nelle colture di una data serie o di più serie messe a confronto questa altezza fosse uguale, ma questa non è stata sempre costante in tutte le numerose esperienze da me istituite; è perciò che in una parte delle esperienze io ho misurato a centimetri e a millimetri l'altezza dello strato di gelatina fluidificata e questo procedimento permette di confrontare fra loro tutti i risultati e di seguire tutto l'andamento del processo di fluidificazione.

Inoltre, fatto anche questo che già ho rilevato nel mio primo lavoro, anche con germi della stessa provenienza e della stessa virulenza, coltivati contemporaneamente alla stessa temperatura e sullo stesso substrato nutritivo, disposto in strati della stessa altezza, e in provette dello stesso diametro, la fluidificazione in alcune provette procede più rapidamente, in altre un po' più lentamente; così p. es. nella serie di provette, a strato di gelatina ugualmente alto, mantenute a 16°-17° C., in alcune la fluidificazione totale della gelatina si

(1) Nel citato lavoro io concludevo che la temperatura *optimum* per la produzione dell'enzima proteolitico non sempre coincide con la temperatura *optimum* di sviluppo. E' ciò che vedremo meglio in seguito. Per ora ricordo che Gage (XI) ha trovato che mantenendo a 37°-40° C., invece che a 20°, le colture in gelatina, in generale non si ottiene una accelerazione della fluidificazione. In queste ricerche bisogna però studiare separatamente l'influenza che la temperatura esercita sulla produzione dello enzima gelatinolitico e sulla azione di questo. Ma di ciò, ripeto, ci occuperemo più avanti.

compi in 29 giorni, in altre in 35. Questa differenza di comportamento, non attribuibile a un determinato fattore tra quelli la cui influenza sullo sviluppo dei germi è nota, può dipendere forse dalla *diversa vitalità individuale e dalla diversa attitudine dei singoli individui di una determinata coltura batterica a produrre enzimi*; è noto p. es. che i singoli individui di una stessa coltura presentano differenze notevoli nella loro resistenza ai disinfettanti; non è quindi improbabile che tali differenze individuali si manifestino anche nella proprietà enzimo-produttiva.

Per quanto poi riguarda i risultati delle mie esperienze, bisogna tener presente una particolarità su cui non ho insistito nel mio precedente lavoro e che in parte può spiegare le differenze nei risultati ottenuti da me e da Mavrojannis ed è questa: quando nei tubi di coltura si era iniziata la fluidificazione della gelatina, io tutte le volte che esaminavo le colture (e ciò in principio accadeva tutti i giorni) sottoponevo le provette a un rapido movimento di rotazione, che determinava una mescolanza intima degli strati superficiali con gli strati più profondi di gelatina fluidificata; con ciò si viene a favorire la diffusione degli enzimi (prodotti dalle cellule batteriche sviluppatesi in superficie (1) e la loro azione su tutta la gelatina, e nello stesso tempo si porta alla superficie un materiale nutritivo meno esaurito e quindi capace di dar luogo a un ulteriore intenso sviluppo della coltura; tutto questo naturalmente determina una più rapida gelatinolisi, tanto più rapida quanto più efficace e ripetuta è stata la mescolanza; il procedimento da me seguito può quindi anch'esso spiegare in parte le differenze apparentemente inesplicabili sopra riferite. E che in realtà *l'agitazione della gelatina fluidificata favorisca la rapidità di fluidificazione della rimanente gelatina*, l'ho constatato sperimentalmente seminando contemporaneamente, in provette contenenti strati ugualmente alti della stessa gelatina, dei vibrioni colerigeni provenienti tutti da una stessa coltura e mantenendo tutte le provette a 22° C.; a fluidificazione iniziata, sottoposi tutti i giorni, per pochi secondi ogni volta, una metà delle provette alla rotazione; in queste la fluidificazione si effettuò più rapidamente che nelle altre; la differenza, insensibile nei primi giorni, crebbe sempre più nei giorni successivi, in quanto che la rapidità di fluidificazione si mantenne costante o quasi nelle provette agitate, e diminuì invece progressivamente in quelle non agitate, tanto che quando nelle prime tutta la gelatina (alta cm. 4 1/2) era già fluidificata (ciò che si effettuò dopo 17-20 giorni), nelle altre era fluidificata per poco più della metà soltanto (per cm. 2 1/2), e perchè diventasse fluida la

Agitazione dei tubi di coltura.



(1) E' noto che il *Vibrio cholerae* si sviluppa molto più rigogliosamente e abbondantemente in superficie. Ricorderò che De Waele e Vandeveldt (VD) han trovato che il fermento proteolitico del *Bacillus megatherium* (che si sviluppa anch'esso in superficie), coltivato in gelatina a 37° C., fluidifica la gelatina solo in superficie e sembra che non si diffonda uniformemente in tutto il substrato.

restante gelatina (cm. 2) occorsero altri 20 giorni circa. La stessa favorevole influenza dell'agitazione delle provette è stata da me riscontrata nelle esperienze coi filtrati attivi di colture diverse. Fermi (IX) ha fatto una osservazione analoga per la tripsina: in due provette di gelatina aggiunte 10 cmc. di una soluzione di tripsina a 1‰, e lasciò una provetta in riposo mentre traverso la soluzione dell'altra fece gorgogliare una corrente d'aria; dopo 2 giorni nella prima provetta la gelatina era fusa per 1 mm., nella seconda per mm. 2 $\frac{1}{2}$. *Qui la causa che ha favorito la gelatinolisi deve ricercarsi soltanto nel contatto continuamente rinnovato fra gelatina e enzima, nel caso mio invece deve aver concorso anche una aumentata produzione di enzima, in dipendenza dell'accresciuto sviluppo batterico, constatabile macroscopicamente (sedimento molto più abbondante al fondo della provetta).*

Infine osserverò che per quanto si riferisce alla constatazione della compiuta fluidificazione (nel caso delle colture a 37° C.) e soprattutto a quella della avvenuta peptonizzazione (intesa nel significato detto sopra, cioè di trasformazione in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide), non si può pretendere di colpire tale trasformazione proprio al momento in cui essa si è effettuata; le cifre da me riportate sopra si riferiscono al numero dei giorni trascorsi dalla semina alla esposizione alla formaldeide; nulla quindi di più probabile che, al momento di tale esposizione, in alcune provette la peptonizzazione fosse già compiuta da qualche tempo e che perciò le cifre sopra riportate siano spesso superiori al vero.

Conclusione.

Se si tiene conto di tutte queste circostanze, si vede che non bisogna pretendere di spiegare con le sole variazioni di temperatura quelle variazioni di rapidità della gelatinolisi sulle quali tanti diversi fattori possono avere influito. Solo da un grande numero di esperienze, condotte in condizioni il più possibilmente uguali, si può dedurre qualche conclusione molto generica e a me sembra che le mie esperienze mi autorizzino a concludere che la gelatinolisi prodotta dal vibrione colerigeno è molto più rapida a 37° C. che a 20°-24° C. e più rapida a 20°-24° C. che a 16° C.; ad ogni modo anche ad una temperatura così bassa il Vibrio cholerae è capace di trasformare la gelatina in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide.

Non bisogna però credere che la temperatura influisca soltanto sullo sviluppo del germe e sulla produzione della proteasi; essa influisce anche direttamente sull'azione di questa. È questo un fatto oramai molto noto per tutti gli enzimi in generale, e che io ho constatato, come vedremo più innanzi, per le proteasi batteriche (Vibrio cholerae e Bacillus anthracis) e ifomicetiche (Aspergillus niger e Asp. effusus) e che recentemente la Petruschewsky (XXIV) ha trovato anche per la proteasi (endotriptasi) contenuta nelle cellule blastomicetiche uccise. Fermi (IX) poi ha trovato che la maggiore attività della tripsina determinata da una più alta temperatura non è costante per le diverse soluzioni di gelatina da lui impiegate e che essa è influenzata sia dalla concentrazione della

gelatina, sia (in misura anzi più forte e più regolare) dalla reazione di questa, nel senso che nella gelatina neutra (che è molto meno sensibile alla tripsina di quella alcalina) l'influenza favorevole delle alte temperature si fa sentire molto di più che in quella alcalina.

Che campioni di uno stesso germe di provenienza diversa si comportino diversamente rispetto alla rapidità di fluidificazione e di peptonizzazione della gelatina, questo è già stato messo in evidenza nel mio precedente lavoro (XXX), sia per il *Bacillus anthracis*, sia, e ancora più, per il *Vibrio cholerae*. Del resto, per quanto almeno riguarda questi due germi, era già noto da tempo che le colture lungamente trapiantate in laboratorio, e specialmente quelle per le quali i trapianti si sono eseguiti a lunghi intervalli o sono stati fatti su terreni non troppo appropriati (1), perdono a poco a poco il loro potere gelatinolitico e finiscono per trasformarsi in germi non liquefacenti; ed è solo con speciali procedimenti che si può far loro riacquistare la capacità di fondere la gelatina; così pure è noto che il *Bacillus fluorescens liquefaciens* può perdere tale capacità fino al punto da non distinguersi più dal *B. fluorescens non liquefaciens*. Quanto al colera, Haffkine (XIII) dice che anche i vibrioni recentemente isolati dall'intestino dei colerosi si comportano molto diversamente rispetto alla fluidificazione della gelatina e « la variazione si estende fra una perdita completa di questa proprietà e la capacità di fluidificare l'intero volume di gelatina ». Recentemente anche De Waele e Vandeveldt (VI) han trovato forti differenze nella fluidificazione della gelatina (e nella dissoluzione della caseina) per campioni di *Vibrio cholerae* (e anche di *B. enteritidis*) di provenienza diversa.

Non avendo avuto a mia disposizione stipiti diversi di vibrione di Koch isolati di recente dall'intestino di colerosi, non mi è stato possibile riscontrare se le differenze nel potere di fluidificazione siano in realtà così estese come afferma l'Haffkine. Dalle mie esperienze risulta invece confermato che le colture di colera trapiantate per lungo tempo in laboratorio fluidificano e peptonizzano la gelatina più lentamente di quelle isolate di recente dalle feci di colerosi o mantenute virulente con passaggi traverso agli animali; parrebbe quasi anzi che virulenza e attività proteolitica andassero di pari passo. Con nessuno infatti dei cinque campioni da me esaminati nelle precedenti esperienze potei mai constatare una fluidificazione e una peptonizzazione così rapida come col sesto stipite, che io ho preso in esame fin dall'ottobre del 1905,

Attività gelatinolitica di campioni diversi di uno stesso germe.

Virulenza e potere gelatinolitico.

(1) Secondo Liborius molti germi liquefacenti perdono completamente o quasi il loro potere gelatinolitico se coltivati anaerobicamente o in terreni contenenti sostanze riducenti (ad es. in terreni glucosati). Sanfelice anzi ha trovato che con una prolungata coltura anaerobica il *Vibrio cholerae* e altri liquefacenti si possono trasformare in varietà che anche coltivate aerobicamente non fluidificano più. Risultati uguali ottennero Hueppe e Wood coltivando in brodo fenicato e la nuova proprietà era tanto più stabile quanto più a lungo si erano protratti i trapianti in brodo fenicato.

poco dopo che esso era stato isolato dalle feci di un coleroso in Germania, e la cui virulenza è sempre stata mantenuta più o meno alta con passaggi continui traverso alle caviglie; ancora oggi, dopo quasi due anni, il potere gelatinolitico di questo stipite è molto più forte di quello degli altri 5 stipiti e per quanto nel corso delle mie esperienze io non abbia sempre determinato esattamente il grado di virulenza della coltura impiegata e il grado del potere gelatinolitico, pure in linea generale ho osservato che *quanto più virulenta era la coltura, tanto più attiva essa si mostrava nella gelatinolisi*; qualche rara eccezione riscontrata può trovare la sua spiegazione nell'una o nell'altra delle tante cause, enumerate sopra, che influiscono sulla gelatinolisi.

Se si considera quali e quanti siano i fattori che favoriscono od ostacolano la produzione e l'attività delle proteasi, si capisce come io e Mavrojanis operando in condizioni diverse abbiamo ottenuto risultati diversi.

Soprattutto per quel che riguarda il *Vibrio cholerae*, le differenze dei risultati possono essere imputate alla diversa attitudine proteolitica dei campioni adoperati. Forse il Mavrojanis si è servito di colture di colera trapiantate da lungo tempo in laboratorio e la cui virulenza, non rinforzata mai con passaggi negli animali, doveva esser nulla o quasi. Quanto alla temperatura, il Mavrojanis manteneva le sue colture a 20° C., temperatura che non è certo la più favorevole alla produzione (da parte del *Vibrio cholerae*) della gelatinasi e all'azione di questa; pure noi abbiamo visto come a questa temperatura con colture molto virulenti la peptonizzazione completa della gelatina si effettuasse in 11-12 giorni soltanto. Quanto alla composizione e reazione della gelatina, il Mavrojanis dice di avere adoperato la comune gelatina nutritiva al 10%; nessun cenno è fatto sulla alcalinità di essa, che pure influisce fortemente sullo sviluppo del *Vibrio cholerae* e sulla attività della sua gelatinasi, come vedremo tra poco. Non dice infine il Mavrojanis se egli agitasse o no le colture, etc.

Vibrione del colera e altri vibriani.

Tutte queste condizioni, ma soprattutto la provenienza e virulenza delle colture, spiegano anche i risultati diversi ottenuti da me e dal Mavrojanis col vibrione di Metchnikoff. Agli coltivando i suoi due stipiti di vibrione di Koch e di Metchnikoff alla stessa temperatura (20° C.) e sulla stessa gelatina (comune gelatina nutritiva al 10%), constatò che il primo fluidificava la gelatina molto più lentamente del secondo e non riusciva mai a peptonizzarla, mentre il secondo già dopo sei o sette giorni aveva trasformato in peptone la porzione fluidificata di gelatina. Io invece coltivando contemporaneamente alla stessa temperatura (24° C.) e sulla stessa gelatina (comune gelatina nutritiva 12%) il sesto stipite virulentissimo di colera e uno stipite di vibrione di Metchnikoff lungamente trapiantato in laboratorio, ho constatato che il primo fluidificava tutta la gelatina in 7-8 giorni e la peptonizzava in 15 giorni, mentre il secondo la fluidificava in 14-15 giorni e dopo 20 giorni non l'aveva ancora trasformata.

in un prodotto non risolidificabile dalla formaldeide. Anche a 37° C., mentre il colera peptonizzò la gelatina in 3 giorni e forse meno, il vibrione di Metchnikoff non vi riuscì. I risultati miei e quelli di Mavrojannis rispetto a questi due vibrioni sono dunque assolutamente contraddittori e tali divergenze non si possono spiegare che con i motivi sopra esposti.

Contemporaneamente al vibrione di Metchnikoff coltivai anche, sia a 24°, che a 37° C., il vibrione di Massaua e il *Vibrio danubicus*, ambedue lungamente trapiantati in laboratorio: a 24° il primo fluidificava la gelatina in 6-7 giorni, il secondo in 13-15 giorni, ma dopo rispettivamente 12 e 23 giorni essi non la avevano ancora peptonizzata; a 37° il 1° fluidificava la gelatina in 36-48 ore, il 2° in 3-4 giorni e quest'ultimo dopo 5 giorni ancora non l'aveva peptonizzata, mentre il 1° aveva compiuto tale trasformazione dopo tre giorni soltanto. Quanto al vibrione di specie indeterminata isolato dall'acqua di Chiaravalle, esso, coltivato a 24°, fluidificò la gelatina in 48 giorni, ma la gelatina, esposta dopo un altro giorno alla formaldeide, rimase fluida.

In conclusione, di tutti i vibrioni (nove-dieci specie diverse) e di tutti gli stipiti di vibrione colerigeno (sei) da me esaminati, quello che ha mostrato di possedere in più alto grado il potere di fluidificare e peptonizzare la gelatina è stato il 6° stipite di *Vibrio cholerae* (virulento) e quello che più si è avvicinato ad esso è stato il vibrione di Massaua. Non solo quindi non risulta dalle mie esperienze che il vibrione del colera sia incapace di trasformare la gelatina in un prodotto non risolidificabile dalla formaldeide (in tutti i 6 stipiti da me esaminati esso ha compiuto questa trasformazione anche se coltivato a basse temperature), ma anzi per uno degli stipiti la trasformazione ha avuto luogo più rapidamente che per tutte le altre nove specie di vibrioni da me esaminate (eccezione fatta per il vibrione di Massaua) e ciò non solo a 37° ma anche a 24° C.

L'azione della formaldeide sulla gelatina fluidificata non può dunque essere utilizzata nella diagnosi (sia pure di laboratorio) del vibrione di Koch per differenziare questo dagli altri vibrioni più o meno affini.

* *

Nel mio precedente lavoro concludevo che i 25 germi fluidificanti la gelatina da me esaminati (18 Schizomiceti e 7 Ifomiceti) erano tutti capaci di trasformarla in un prodotto non solidificabile dalla formaldeide; a questi 25 bisogna ora aggiungerne altri otto, di cui 3 Schizomiceti (*Vibrio danubicus*, *Vibrio Massauae*, *Vibrio Metchnikoff*) e 5 Ifomiceti (*Aspergillus versicolor* Tirab., *Asp. ochraceus* Wilhelm, var. *Ceni* e *Tiraboschi*, *Asp. novus* Wehmer, *Asp. effusus* Tirab.), che ho sperimentato in seguito, e se vogliamo tener conto dei risultati positivi ottenuti dallo stesso Mavrojannis per i vibrioni di Deneke e di Finkler-Prior, possiamo concludere che di tutti i 35 germi (23 Schizomiceti e 12 Ifomiceti)

La gelatinolisi nei microrganismi in genere.

liquefacienti la gelatina finora saggiati neppure uno è assolutamente incapace di peptonizzarla. Anche per le nuove specie esaminate ho visto che se la gelatina liquefatta è esposta troppo presto ai vapori di formolo, prima che la proteasi prodotta abbia avuto tempo di esplicare la sua azione, essa è risolidificata. Tutti i liquefacienti quindi trasformano dapprima la gelatina in una sostanza, fluida anche a basse temperature, ma risolidificabile dal formolo, e solo in seguito in un prodotto non più solidificabile.

Influenza della composizione e reazione del terreno colturale.

Ho accennato più volte alla influenza che sulla gelatinolisi per opera dei germi esercitano la composizione e reazione del substrato colturale. Già nel mio precedente lavoro avevo rilevato questa influenza; p. es. avevo trovato che i cinque stipiti di *Vibrio cholerae* fluidificavano più rapidamente la comune gelatina nutritiva che quella di Abba, mentre il contrario accadeva per i vibroni acquatili da me esaminati: gli uni e gli altri fluidificavano più rapidamente quel terreno a base di gelatina nel quale trovavano condizioni migliori per il loro sviluppo. Ma come già ho detto per il fattore temperatura, così anche per questo altro fattore bisogna ricordare che esso esplica la sua influenza non solo sulla produzione della proteasi, ma anche sulla attività di questa. Naturalmente la rapidità della gelatinolisi è anche in rapporto con la concentrazione della gelatina; tanto più questa è alta, tanto più lenta è la fluidificazione; secondo Terni (IX) le differenze sono tanto più rilevanti quanto più sfavorevoli sono le altre condizioni e inoltre esse sono più manifeste all'inizio della fluidificazione. Bisogna anche tener conto del modo di preparazione e di conservazione del terreno a base di gelatina etc.

Ricerche di altri autori sugli Ifomiceti.

Ma è soprattutto nello studio degli Ifomiceti fluidificanti la gelatina che ho preso in considerazione questo fattore, coltivandone varie specie contemporaneamente su molti substrati a base di gelatina. Anzitutto ricorderò che il potere gelatinolitico è così diffuso tra gli Ifomiceti che generalmente si afferma che tutti gli Ifomiceti sono capaci di fluidificare la gelatina. Io ho esaminato da questo punto di vista moltissime specie di *Aspergillus*, *Penicillium*, *Oospora*, etc. e ho trovato che tutte fluidificano la gelatina: una sola eccezione avrei riscontrato, rappresentata dall'*Aspergillus glaucus* Link, che coltivato da me a temperature diverse e su svariati terreni a base di gelatina, non ha mai liquefatto questa anche quando il suo sviluppo era rapido e rigoglioso; il Wehmer però (XXXV), che ha coltivato questa muffa su gelatina al mosto di birra (« Bierwürzelgelatine »; gelatina al 5 %), ha trovato che essa la fluidifica lentissimamente. (1) Il Wehmer (1895) (XXXIV) è stato il primo che ha fatto delle esperienze comparative con molte specie di *Aspergilli* e *Penicilli*, coltivandoli su questa « Bierwürzelgelatine », e ha tro-

(1) Mi sono procurato da Kral una coltura del campione di *A. glaucus* adoperato da Wehmer; anch'esso non è mai pervenuto a liquefare nessuno dei terreni di gelatina da me adoperati.

vato che alcuni (*Aspergillus niger*, etc.) la fluidificano piuttosto rapidamente, altri (*Asp. glaucus*, *fumigatus*, *varians*, etc.) molto lentamente.

Quanto alla influenza della reazione del terreno a base di gelatina ricorderò che secondo Hansen (XIV) il *Penicillium glaucum* fluidifica più rapidamente la gelatina neutra che quella acida; secondo Stoll (XXIX) i *Pen. olivaceum*, *italicum*, *rubrum* e *purpureogenum* fluidificano ugualmente la gelatina alcalina e acida, mentre il *Pen. brevicaulis* fluidifica più rapidamente quella alcalina che quella acida; quanto al *Pen. glaucum* un aumento nell'aggiunta di alcali (soluzione normale di soda) o di acido (acido solforico normale) sembra che favorisca la gelatinolisi.

Quanto alla composizione del terreno, Hansen ha trovato che il *Pen. glaucum* fluidifica con la stessa rapidità la gelatina zuccherata che quella senza zucchero: Schäffer (XXVI) che ha studiato molti *Aspergilli* e *Penicilli* conclude che la presenza di zucchero ordinariamente non impedisce la produzione di gelatinasi; secondo Stoll infine i *Pen. brevicaulis*, *italicum*, *olivaceum*, *purpureogenum*, *rubrum* non sarebbero capaci di fluidificare una gelatina zuccherata (contenente il 2 % di destrosio (1): solo il *Pen. glaucum* la fluidificherebbe, ma lentamente, e un aumento nella percentuale dello zucchero ritarderebbe ancora più la fluidificazione.

Le specie di Ifomiceti da me studiate comparativamente nel loro potere gelatinolitico sono le seguenti: *Aspergillus effusus* Tirab., *A. fumigatus* Fres., *A. glaucus* Link, *A. novus* Wehmer, *A. ochraceus* Wilhelm, *Asp. ochraceus* var. *microspora* Tirab., *A. varians* Wehmer e *A. varians* Ceni (*A. versicolor* Tirab.), più una specie indeterminata di *Oospora* e altre due specie indeterminate di muffe. I terreni nutritivi a base di gelatina, adoperati in questa serie di ricerche, furono i seguenti: 1ª Semplice soluzione di gelatina 10 % in acqua dist.; reazione acida; punto di fusione vicino a 30° C.; 2ª La stessa, più saccarosio 3 %; 3ª La stessa, più Na Cl 0,5 %; 4ª La stessa, con saccarosio 6 %; 5ª La stessa, con glucosio 3 %; 6ª Comune gelatina nutritiva al 12 %; reazione alcalina; punto di fusione vicino a 25° C.; 7ª La stessa, con glucosio 2,5 %; 8ª Gelatina al liquido di Raulin (soluzione al 20 % di gelatina in acqua + liquido di Raulin, mischiati a parti uguali) (2), reazione fortemente acida; punto di fusione sopra a 30° C.; 9ª La stessa, ma con liquido di Raulin ridotto a saccarosio 6 %, acido tartarico 0,3 % e nitrato di ammonio 0,3 %.

Le spore delle specie prese in esame erano seminate contemporaneamente e presso a poco nella stessa quantità in provette dello stesso diametro e contenenti strati ugualmente

Nuove mie ricerche.

(1) Evidentemente lo Stoll ha trascurato lo studio di altri fattori che influiscono sulla gelatinolisi per opera delle muffe: infatti, per quanto riguarda p. es. il *Pen. brevicaulis*, Wehmer (XXXVI) ha trovato che esso fluidifica la sua « Bierwürzelgelatine », la quale è una gelatina zuccherata.

(2) Sul modo di preparare questa gelatina vedi: TIRABOSCHI, *Terzo Congresso Pellagrologico Italiano*, 1906.

alti delle diverse gelatine ora enumerate; per tutta la durata dell'esperimento tutte le provette erano conservate alla stessa temperatura, che nelle diverse esperienze oscillò da 18° a 28° C.; tutti i giorni in principio, ogni 3-4-5 giorni in seguito, agitavo le provette per provocare la diffusione della proteasi prodotta in superficie (1).

I risultati da me ottenuti sono raccolti, sinteticamente e a grandi tratti, nella qui unita tabella, dalla quale si vede che l'influenza esercitata dalla reazione e dalla presenza di determinate sostanze non è stata uguale per tutte le specie di muffe da me esaminate; non mi dilungo quindi in molte considerazioni, tanto più che dovrò tornare sull'argomento a proposito dell'influenza che questi stessi agenti esercitano sull'attività gelatinolitica dei filtrati di colture batteriche e ifomicetiche. Solo osserverò qui che l'aggiunta di saccarosio o di glucosio al 3 % (i due zuccheri si comportano ugualmente o quasi) generalmente accelera la gelatinolisi (colonne 1^a, 3^a e 5^a; colonne 6^a e 7^a); solo fanno eccezione, fra le specie da me esaminate, i due tipi di *Aspergillus ochraceus*. (2) Così pure in tutte (o in quasi tutte) le muffe da me studiate la gelatinolisi è più rapida sulla gelatina fatta con liquido di Raulin ridotto, che su quella con liquido di Raulin integro. Queste diversità di fluidificazione dipendono da una diversa produzione di gelatinasi o da una diversa attività di questa? E' impossibile dare qui la risposta.

* *

Studio della attività
delle proteasi in
assenza dei germi
che le hanno pro-
dotte.

Tutte le ricerche di cui ho esposto finora i risultati, come pure tutte quelle descritte nella mia pubblicazione del 1905, sono state eseguite con colture su gelatina; non è perciò possibile distinguere in esse, nello studio delle molteplici cause che influiscono sulla gelatinolisi, la parte che riguarda la produzione di una gelatinasi per opera dei germi, da quella che riguarda l'attività di questa stessa proteasi. Già abbiám detto che le proteasi di origine batterica e ifomicetica possono agire indipendentemente dalla presenza dei germi e che la loro azione è influenzata da quegli stessi fattori che influiscono anche sulla produzione di esse da parte

(1) L'agitazione frequente delle colture ha qui una grande importanza, perchè gli ifomiceti si sviluppano alla superficie della gelatina, formando col micelio e con lo strato conidifero un feltro compatto, che costituisce l'unico punto di produzione della proteasi. La dimostrazione sperimentale di questa importanza l'ho ottenuta con lo stesso procedimento già indicato per il *Vibrio cholerae* (v. p. 13); così pure se si agita una coltura, p. es. di *Asp. niger*, in gelatina (lasciata a sé per 15 giorni a 25°, e nella quale lo strato di gelatina fluidificata sia alto 1 cm. circa), si constata subito un rapido progresso della gelatinolisi, dovuto evidentemente al fatto che la gelatinasi accumulata alla superficie è portata a contatto della gelatina non ancora liquefatta e esplica su di essa la sua azione.

(2) Se il quantitativo del saccarosio si porta al 6 %, (colonna 4^a) la gelatinolisi diminuisce; almeno così è accaduto nelle colture di *Aspergillus fumigatus*.

Altezza in mm. dello strato di gelatina fluidificata da diverse specie
di Ifomiceti coltivati su gelatine diverse.

SPECIE DI MUFFA	Tempe- ratura	Giorni di coltura	Varie specie di terreni nutritivi a base di gelatina (v. testo)								
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
Asp. effusus Tirab.* (1 camp., da granturco)	23°-25°	8	28		10		10	12	12	8	32
		15	25		28		25	25	26	20	50
		30	40		50		50	38	40	35	?
Asp. fumigatus Pres. (diversi campioni isolati dal granturco)	23°-25°	8	—	—	4	3		3			12
		15	—	—	6	5		6			18
		30	—	5	15	8		15			27
		90	—	28	43	31		37			55
Asp. glaucus Link (1 camp. isolato dal mais e 1 prov. da Wehmer)	17°-21°-25°	90	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp. novus Wehmer (1 campione, proveniente da Wehmer)	23°-25°	8	10		8		8	6	6	—	4
		15	28		30		30	15	20	16	22
		30	40		50		46	26	32	30	35
		60	50		?		65	38	47	45	50
Asp. ochraceus Wilhelm <i>var. microspora</i> Tirab. (isolato da pane e da mais)	23°-25°	8	15		12		14	18	20	5	10
		15	28		22		26	26	28	12	22
		30	40		30		35	32	35	20	35
Asp. ochraceus Wilhelm (1 campione, proveniente da Ceni)	23°-25°	8	14		12		12	16	15	7	10
		15	30		25		25	24	20	20	24
		30	45		35		35	38	32	30	38
Asp. varians Wehmer (parecchi campioni, isolati dal granturco)	23°-25°	8	5		15		15	11	15	—	—
		15	20		28		32	20	30	?	5
		30	40		50		50	36	45	20	26
Asp. versicolor Tirab. (1 campione, proveniente da Ceni) (<i>Asp. varians</i> Ceni)	23°-25°	8	10		8		8	5	8	4	4
		15	18		15		16	12	17	18	20
		30	26		30		34	22	30	36	37
		60	40		50		55	?	?	?	?

dei germi: temperatura, composizione e reazione del terreno a base di gelatina, modo di preparazione e stato di conservazione di esso, concentrazione della gelatina etc. Ho voluto quindi determinare in quale misura queste diverse cause influiscono sulla attività gelatinolitica delle proteasi batteriche e ifomicetiche.

Lo studio di queste proteasi in assenza dei germi è già stato fatto da vari osservatori; per quello che riguarda gli Schizomiceti, rimando alla mia nota a pag. 7 e al bel libro di Fuhrmann (X); per quanto si riferisce agli Ifomiceti, il materiale di osservazione è molto più scarso: ricorderò gli studi già citati di Malfitano e di Bourquelot sulla proteasi di *Aspergillus niger*, di Hansen, di Bourquelot, di Duclaux, di Gravina etc. su quella del *Penicillium glaucum*. Il Gravina anzi, nella sua ultima nota pubblicata nel Gennaio di quest'anno (XII), accenna anche alla importanza che gli enzimi segregati dagli Ifomiceti possono avere nella determinazione della sintomatologia osservata dai diversi sperimentatori che si sono occupati dei veleni delle muffe in rapporto alla pellagra (1).

Sulla endotriptasi dei Blastomiceti vedi l'articolo di Hahn e Lafar pubblicato nel IV volume (pag. 438-447; anno 1906) dell'*Handbuch der technischen Mykologie* di Lafar; sulla gelatinolisi dei Saccaromiceti e Schizosaccaromiceti vedi l'articolo di Klöcker, nello stesso volume (pag. 180, 187, 190; anno 1906) e quello di Müller-Thurgau (pag. 318-327); sulla gelatinolisi nelle Mucorinee consulta l'articolo di Wehmer (pag. 524-525; anno 1907). Il volume III dello stesso trattato, contiene anche a pag. 119-128 (1904) un riassunto sulla proteolisi nei batteri.

Mie ricerche.

Le mie esperienze riguardano *Vibrio cholerae* e *Bacillus anthracis* tra gli Schizomiceti, *Aspergillus effusus* Tirab. (e in parte *Asp. niger* v. Tiegh., *Asp. fumigatus* Fres e *Pen. glaucum* Link) tra gli Ifomiceti. Sarebbe stato bene adoperare nelle singole esperienze soluzioni enzimatiche il più possibilmente pure; siccome però non è possibile ricavare enzimi puri e siccome i metodi per averli in uno stato anche di relativa purezza sono lunghi, così per brevità mi sono servito del filtrato di colture dei diversi germi. Naturalmente questi filtrati, accanto all'enzima proteolitico, contengono altri enzimi e una infinità di altre sostanze (prodotti di ricambio del germe, sostanze diverse originatesi dalle azioni enzimatiche che si sono svolte nel liquido colturale, sostanze contenute in questo e rimaste inalterate etc.), di cui alcune possono influire, e anche fortemente, sulla intensità di azione della proteasi; ma siccome nelle singole serie di esperienze

(1) Il Gravina così conclude: « Le asserzioni di Gantier e di Roussey e i risultati delle mie esperienze non lasciano dubbio che gli enzimi si devono considerare come *toxines-ferments* e che inoculati sottocute negli animali da esperimento determinano una sintomatologia grave di predominio del sistema nervoso, ed anche la morte. Le estrazioni con alcool, etere, cloroformio, acqua, comunemente usate per ottenere il tossico, sia dagli ifomiceti sia dal substrato colturale, sono appunto i mezzi comuni di estrazione degli enzimi.... ».

usavo sempre lo stesso filtrato di una stessa coltura, l'influenza esercitata da queste diverse sostanze, se non scompare, certo resta molto attenuata.

Le colture batteriche furono fatte nel comune brodo nutritivo a reazione alcalina, quelle di muffe in liquido di Raulin; le une e le altre in grandi bottiglie di Erlenmeyer, delle stesse dimensioni, contenenti tutte la stessa quantità di liquido (per circa 1½ cm. d'altezza), e mantenute alla temperatura *optimum* per lo sviluppo del germe in esame; in alcuni casi, per vedere se questa costituisse anche l'*optimum* per la produzione della gelatinasi, ho fatto anche colture a temperature più basse. Ottenuto, in capo a 3-7 giorni, uno sviluppo rigoglioso, riportavo il liquido colturale sempre allo stesso volume e poi filtravo attraverso a candele sterilizzate, aggiungevo (per precauzione) del timolo alla dose del 2‰ (1) e distribuivo con pipette sterili nei diversi *tubi di gelatina*. Questi erano tutti dello stesso diametro, contenenti tutti la stessa quantità di gelatina, la quale quindi raggiungeva in tutti i tubi la stessa altezza, indicata da un listino di carta; nelle singole esperienze i singoli terreni alla gelatina erano non solo della stessa concentrazione, composizione e reazione, ma anche della stessa preparazione, cosicchè tutti i tubi di un dato terreno contenevano gelatina perfettamente identica, avente lo stesso preciso punto di fusione etc.; quando per una stessa gelatina dovevo ripetere esperienze in epoche diverse, le provette venivano conservate al buio e saldate alla lampada, così da evitare l'azione della luce e soprattutto la evaporazione e quindi le variazioni nel grado di concentrazione della gelatina.

Metodo di ricerca.

Per studiare l'intensità di fluidificazione generalmente seguivo il metodo di Fermi, cioè versavo un determinato volume di filtrato (ordinariamente 2 cmc.) sopra alla gelatina solida, portavo le provette a una determinata temperatura (generalmente da 20° a 25° C.) e misuravo (dapprima giorno per giorno, in seguito a intervalli più lunghi) esattamente lo strato di gelatina fluidificata; tutti i giorni poi agitavo le provette e ciò non solo favoriva, come ho già dimostrato, la gelatinolisi, ma lasciava veder meglio il limite di fluidificazione. Malfitano (XX) dice che il metodo di Fermi è poco preciso e sensibile perchè la temperatura alla quale si è obbligati di sperimentare è incostante e perciò egli ha seguito l'altro metodo di mischiare intimamente quantità determinate di gelatina e di liquido enzimatico e di mantenere i tubi nel termostato a 35°, ritirandoli poi a intervalli determinati, raffreddandoli in un bagno-maria a 15° e considerando la gelatinolisi ultimata quando a questa temperatura la gelatina restava liquida. Io invece ho trovato il metodo di Fermi abbastanza preciso (2) e sensibile: la temperatura si può

(1) A questa dose il timolo, mentre impedisce lo sviluppo dei germi, non ostacola affatto o quasi l'azione della proteasi.

(2) Col metodo seguito da Malfitano non si riesce sempre a cogliere il momento preciso in cui avviene la fluidificazione della gelatina, cioè

mantenere costante con un termostato a bassa temperatura e le variazioni che possono succedere in esso sono uguali a quelle che possono succedere in un termostato ad alta temperatura (1). Qualche volta, specialmente per studiare l'influenza della temperatura sulla intensità della gelatinolisi, ho seguito anche io naturalmente il metodo preferito da Malfitano, mischiando sempre la stessa quantità di filtrato (2 cmc.) alla stessa quantità di gelatina (8 cmc.) e osservando dopo quanto tempo la gelatina restava fluida a 10° e a 0° (provette immerse per $\frac{1}{2}$ ora in acqua a 10° e in ghiaccio fondente) e quando era trasformata in un prodotto non più solidificabile dalla formaldeide (gelatina fusa versata in capsuline, esposte per due e più mesi ai vapori di formalina nel modo detto altrove).

Nelle mie esperienze mi sono occupato principalmente di tre fattori che possono influire sulla attività delle proteasi batteriche e ifomicetiche e cioè della composizione e reazione del terreno a base di gelatina, della temperatura a cui si lasciava agire il liquido enzimatico, e della quantità e concentrazione di questo liquido; inoltre ho studiato l'azione distruttiva delle alte temperature e della formaldeide (gassosa o in soluzione acquosa) sulle proteasi, l'influenza che la temperatura e la composizione del substrato culturale esercitano sulla produzione delle gelatinasi etc. Le ricerche sull'azione distruttiva della formaldeide sono state descritte in un altro lavoro (XXXII); gli altri risultati finora ottenuti sono raccolti nelle tabelle che si trovano in fine del presente lavoro; sulla scorta di queste tabelle farò qui alcune osservazioni e conclusioni.

Influenza della composizione e reazione della gelatina.

E anzitutto esaminiamo l'influenza che sulla gelatinolisi esercitano la composizione e reazione della gelatina. I diversi terreni alla gelatina da me adoperati sono quelli indicati nella tabella 1.^a Per tutti e tre i germi da me presi in esame (*Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Aspergillus effusus*), vediamo (tabella 2^a) che la semplice alcalinizzazione della gelatina influisce molto favorevolmente sulla fluidificazione (colonne 1^a e 2^a) e specialmente su quella prodotta dal filtrato di brodo-culture di *Vibrio cholerae*. Leggerissima invece è l'influenza esercitata dalla semplice aggiunta di Na Cl al 0,5 % in un terreno di sola gelatina a reazione alcalina (colonne 2^a e 3^a); se però tale aggiunta si fa in un terreno a reazione acida, contenente oltre alla gelatina anche del saccarosio al 3 % (colonne 4^a e 5^a), l'influsso favorevole esercitato in questo caso da Na Cl è fortissimo, specialmente per il *Vibrio cholerae*; il fatto è interessantissimo, perchè dimostra che l'influenza esercitata da una determinata sostanza sulla attività degli enzimi batterici e ifomicetici varia enormemente col

la perdita della proprietà di risolidificarsi a una bassa temperatura determinata.

(1) Anzi siccome ad alte temperature la gelatinolisi è più intensa, le variazioni di temperatura influiscono in tal caso maggiormente sul fenomeno.

variare delle condizioni di reazione e di composizione del terreno nel quale questa determinata sostanza si aggiunge; qualche cosa di simile è stato già segnalato da Fermi (IX), il quale ha osservato che l'influenza favorevole spiegata dalle alte temperature sulla attività della tripsina varia col variare della concentrazione e, più ancora, della reazione della gelatina, manifestandosi più fortemente per la gelatina a reazione neutra (meno sensibile) che per quella alcalina. La semplice aggiunta di saccarosio al 3 % in un terreno di sola gelatina a reazione acida (colonne 1^a e 4^a) influisce poco o nulla sulla attività gelatinolitica del filtrato di *Vibrio cholerae*, influisce invece fortemente su quella di *Bacillus anthracis* e *Aspergillus effusus*. Il confronto dei dati della colonna 3^a (gelatina con solo Na Cl, ma a reazione alcalina) con quelli della colonna 5^a (gelatina con Na Cl e saccarosio, ma a reazione acida) confermano quanto ho osservato più sopra a proposito dell'influenza diversa esercitata sia dalla alcalinizzazione, sia dal saccarosio al 3 %, sulla attività dei tre filtrati da me studiati; per il *V. cholerae* i dati della colonna 5^a sono uguali a quelli della 3^a, perchè l'azione favorevole del saccarosio è neutralizzata da quella sfavorevole della acidità, mentre per il *B. anthracis* e *Asp. effusus* sono molto più elevati perchè l'influenza favorevole del saccarosio è più forte di quella sfavorevole della acidità. Un aumento nella percentuale del saccarosio dal 3 % al 6 % (colonne 5^a e 6^a) diminuisce l'attività proteolitica di tutte e tre i filtrati e la diminuzione è più sensibile per il *B. anthracis* e più ancora per *Asp. effusus*, cioè proprio per quei due sui quali l'azione favoritrice della dose 3 % si era mostrata più energicamente. L'aggiunta di acido tartarico e nitrato di ammonio al 0,3 % alla gelatina acida con saccarosio 3 % (colonne 4^a e 7^a) influisce favorevolmente sull'attività di tutti e tre i filtrati e questa influenza è quasi uguale (un po' più per *V. cholerae*, un po' meno per *B. anthracis*) a quella spiegata, in uguali condizioni (colonne 4^a e 5^a), dall'aggiunta di Na Cl 0,5 %. Quanto alla comune gelatina nutritiva, i dati raccolti nella colonna 8^a vanno confrontati con quelli della gelatina 2^a, che ha la stessa reazione alcalina della 8^a, ma manca di peptone e Na Cl e invece di essere sciolta in infuso di carne è sciolta in acqua distillata; per tutti e tre i filtrati, ma specialmente per i due batterici, la fluidificazione della gelatina 8^a è stata più rapida di quella della 2^a.

Parrebbe quasi che quella stessa composizione e reazione del terreno a base di gelatina, che favoriscono lo sviluppo di una data specie batterica o ifomicetica, favoriscano anche, benché in diversa misura, l'attività gelatinolitica della proteasi eliminata da questa stessa specie; così per *V. cholerae* e *B. anthracis* il massimo di fluidificazione si è avuto nella gelatina 8^a che è la più favorevole al loro sviluppo, per *Asp. effusus* invece nella 5^a e 7^a che pur sono le più favorevoli al suo sviluppo, come risulta da mie osservazioni; così pure il saccarosio che influisce molto favorevolmente sullo sviluppo degli Ifomiceti in genere (e anche di *Asp. effusus*), ha influito

molto favorevolmente anche sulla attività della proteasi di questa muffa; così anche l'aggiunta di Na Cl, che favorisce lo sviluppo di tutti e tre i germi da me esaminati, ha favorito anche (in determinate condizioni anzi, molto fortemente) l'attività delle loro gelatinasi; così pure la reazione alcalina che è molto favorevole allo sviluppo dei batteri in genere e del *V. cholerae* in specie, ha influito molto favorevolmente sulla attività gelatinolitica del filtrato di *B. anthracis* e più ancora di *V. cholerae*; essa però ha favorito anche quella di *Asp. effusus*, benchè allo sviluppo di questa come di quasi tutte le muffe in genere sia più propizia la reazione acida di quella alcalina.

Le stesse conclusioni sulla influenza che la reazione della gelatina e la presenza di determinate sostanze spiegano sulla attività delle proteasi si possono ricavare dall'esame di qualcuna delle altre tabelle, riguardanti più propriamente lo influsso di altri fattori, ma nelle quali sono anche riferiti i risultati ottenuti con gelatine diverse; così p. es. nella tabella 4^a si vede che, mentre il filtrato di una brodocoltura di tre giorni a 37° di *V. cholerae*, scaldato a 70°, ha ancora fluidificato abbastanza rapidamente la gelatina 8^a, quello di una coltura di quattro giorni, più attivo, scaldato a 70° non ha fluidificato la gelatina 8^a neppure dopo 27 giorni.

Infine dal confronto delle colonne a e b della tabella 2^a risulta che il grado della influenza esercitata dalla composizione e reazione del terreno non è sempre uguale per filtrati di colture diverse di uno stesso germe.

Le conclusioni che si possono dedurre da questa prima serie di esperienze sono che l'attività gelatinolitica dei miei filtrati di colture in brodo di *V. cholerae* e *B. anthracis* e in liquido di Raulin di *Asp. effusus* è stata fortemente favorita dalla reazione leggermente alcalina, e in certi casi dall'aggiunta di piccole quantità (0,5 %) di Na Cl, o di acido tartarico e nitrato di ammonio (0,3 %); quella di *B. anthracis* e *Asp. effusus* è stata favorita moltissimo anche dalla presenza di saccarosio al 3 %, mentre una dose più alta (6 %) di questo zucchero ha attenuata l'azione gelatinolitica; sul filtrato di *V. cholerae* invece, il saccarosio anche alla dose del 3 %, non ha esercitato un influsso apprezzabile. Da questi risultati però, come dirò meglio in seguito, non è lecito argomentare senza altro che si tratti di proteasi diverse.

Per quanto riguarda la reazione della gelatina, i miei risultati ottenuti col *V. cholerae* e *B. anthracis* collimano con quelli degli altri osservatori sulle proteasi di origine batterica, le quali sono state trovate più attive in ambiente leggermente alcalino; quelli invece ottenuti con *Asp. effusus*, mentre collimano con quelli di Hansen (XIV), sono opposti a quelli di Malfitano (XIX). Hansen estrasse con glicerina dalle colture di *Pen. glaucum* un fermento, che fluidificava più rapidamente la gelatina neutra di quella acida. Malfitano filtrò colture di *Asp. niger* su liquido di Raulin e trovò il filtrato più attivo in ambiente leggermente acido e assolutamente inattivo in ambiente anche leggermente alcalino. Per

quanto poi riguarda l'influenza del saccarosio, che io ho trovato molto propizio alla attività gelatinolitica del filtrato di *Asp. effusus*, ricorderò che secondo Hansen l'aggiunta di zucchero non influisce affatto sulla attività gelatinolitica del suo estratto glicerico da colture di *Pen. glaucum*.

Anche riguardo alla influenza della temperatura sulla attività delle proteasi batteriche e ifomicetiche, pochi dati ho trovato nella letteratura (1). Per quanto riguarda le mie osservazioni rimando alla tabella terza, da cui risulta che i tre filtrati da me studiati erano molto più attivi a 20°-22° che a 10°-12°, più a 26° che a 20°-22°, molto più a 37° che a 26° e più a 45° che a 37° (2); anche per piccole differenze di temperatura la differenza è molto forte, come si può vedere nelle colonne 23° e 25°-26° di *V. cholerae* e in quelle 20°-22° e 26° di *B. anthracis*. I filtrati di brodocolture, di quattro e due giorni a 37°, di *V. cholerae* e di quelle su liquido di Raulin, di sette giorni a 36°, di *Asp. effusus* hanno sciolto (benchè lentissimamente) le gelatine 2^a e 8^a, 3^a e 7^a anche a 10°-12° e perfino (*V. cholerae* almeno) a 8°-10°, il che non si è verificato (sulla gelatina 8^a) per il filtrato di brodocolture, di 5 giorni a 37° e a 26°, di *B. anthracis*; di più il filtrato di colture di *V. cholerae* a 37° mischiato alla gelatina 8^a nelle proporzioni di 1 di filtrato per 4 di gelatina, alla temperatura di 37° ha trasformato in dieci ore soltanto la gelatina in un prodotto che restava fluido anche a 0°, mentre il filtrato di colture di *B. anthracis* a 26° non ha fatto questo (mischiato con la stessa gelatina 8^a nelle stesse proporzioni) neppure in due giorni, e quello di colture a 37° neppure in tre giorni; eppure alla temperatura di 25°-26° il filtrato di colture di *B. anthracis* a 26° si è mostrato più attivo di quello di *V. cholerae*; questo in dieci giorni aveva fluidificato la gelatina 8^a per 23 mm. soltanto, quello per 30-32 mm. Dunque i filtrati di brodocolture a 37° di *V. cholerae* (3) erano attivi ad una temperatura molto bassa (8°-10°-12°) alla quale quelli di colture a 37° e 26° di *B. anthracis* erano inattivi (4); a temperature molto alte (37° e 45°) erano molto più attivi di questi; a temperature

Influenza della temperatura.

(1) Come per gli altri enzimi, così anche per queste proteasi si sa che esse sono più attive a temperature relativamente alte e che hanno una temperatura optimum e un limite minimo e massimo; anzi questi limiti e questo optimum sarebbero stati trovati diversi per proteasi di origine batterica diversa. Anche la Petruschewsky (XXIV) ha trovato che la proteasi contenuta nelle cellule blastomicetiche è più attiva a 15°-16° che a 7°-9° e molto più a 32° che a 15°-16°.

(2) Mi sono assicurato con tubi di controllo che tutte le gelatine da me adoperate, mantenute anche per molti e molti giorni alla temperatura di 37° e anche di 45°, non perdevano la proprietà di tornare solide col raffreddamento.

(3) Anche quelli di colture su liquido di Raulin di *Asp. effusus*, saggiati sulla gelatina 7^a, si sono mostrati attivi a 10°-12°, molto più attivi a 37° e a 45° e meno attivi a 23°; ma ho evitato di fare il confronto anche con questi filtrati, perchè il liquido colturale era troppo diverso e diversissima era anche la composizione della gelatina adoperata.

(4) Già ho ricordato che le proteasi di origine blastomicetica sono state trovate attive (Petruschewsky) anche a 7°-9° C.

medie invece erano meno attivi. Anche da questo diverso comportamento dei due filtrati non si può però dedurre in maniera categorica la diversa specificità delle proteasi in essi contenute; a prima vista la diversità del comportamento è molto impressionante e suggestiva, ma se si tien presente ciò che ho detto a pag. 22, si può pur pensare che la diversità del comportamento dipenda dalla diversa composizione dei due filtrati.

Le conclusioni che si possono dedurre da questa seconda serie di esperienze sono che l'optimum di temperatura per l'attività della proteasi contenuta nel filtrato del liquido colturale è molto più alto dell'optimum di sviluppo per la specie batterica o ifomicetica che l'ha prodotta (benchè si tratti di specie che hanno il loro optimum a 37°), che molto più alto è anche il limite massimo, mentre il minimum, per le specie da me esaminate, pare sia presso a poco lo stesso o solo leggermente più basso.

Azione distruttiva
delle alte tempera-
ture.

Più copiosi sono i dati che ho trovati nella letteratura relativamente all'azione distruttiva esercitata dalle alte temperature sulle proteasi batteriche e ifomicetiche. Cito tra gli altri il lavoro di Fermi (VIII), il quale riscaldava per 1 ora a 55°, 60°, 65° e 70° colture di gelatina fluidificata da batteri diversi e poi la faceva agire su gelatina solida in provette; egli trovò che per tutti i sette germi da lui adoperati il riscaldamento a 70° per 1 ora rendeva il liquido enzimatico inattivo; per alcuni, ad es. per lo *Staphylococcus pyogenes aureus*, bastava il riscaldamento a 55°, per altri (*Bacillus subtilis*, *B. megatherium*, *B. fluorescens*) quello a 60°, per altri invece (p. es. *B. di Kieler*) non bastava neppure quello a 65°.

Io ho riscaldato (tenendo immerse in un bagno-maria le provette contenenti i filtrati) a temperature variabili da 50° a 80° per mezz'ora soltanto e ho trovato (tabella quarta) che il potere gelatinolitico (attivissimo) del filtrato di colture (su liquido di Raulin a 35° per sei giorni) di *Asp. effusus*, sperimentato su gelatina 7° a 23°, era attenuato sensibilmente già alla temperatura di 50°, più fortemente ancora a 55°, molto di più a 60°, un po' di più a 65°, molto di più a 70° (fluidificazione estremamente lenta), e che era distrutto a 75°. Per il *B. anthracis* ho adoperato i filtrati di 6 brodo-colture diverse, saggiandone due su gelatina 5° e quattro su gelatina 8°; i primi due (colture a 37° e a 26° di cinque giorni) scaldati fino a 65° per mezz'ora hanno conservata integra o quasi la loro attività, che si è attenuata sensibilmente solo per il riscaldamento a 70°; gli altri quattro (colture a 20°, 24°, 28°, 37° di quattro giorni) scaldati fino a 65° hanno anch'essi conservato quasi intatto il loro potere gelatinolitico, che si è attenuato sensibilmente a 70°, molto di più a 75° (nei filtrati delle colture a 20°, 24°, 37° si è ridotto a $\frac{1}{3}$ circa, in quello di 28° a $\frac{1}{2}$) e ancora di più a 80° (fluidificazione lentissima; gelatina risolidificata a 15°-18°).

Quanto al *V. cholerae* i filtrati di due brodoculture a 37° (una di quattro e l'altra di tre giorni) saggiati rispettivamente

su gelatina 2^a e 8^a a 23°-25° si comportarono diversamente; il primo scaldato a 60° subì una discreta attenuazione e a 70° si mostrò inattivo; l'altro si attenuò pochissimo a 60° (e molto di più a 65°) ma era ancora discretamente attivo dopo essere stato scaldato a 70°. E' questa una prova di più che le differenze di attività proteolitica o di resistenza ai reagenti chimici e fisici (acidi, luce, calore, etc.), riscontrate per soluzioni enzimatiche provenienti da colture batteriche o ifomicetiche diverse, non sono da attribuirsi senz'altro ad una diversa natura della proteasi in esse contenute, giacchè possono dipendere anche da una diversa concentrazione di queste o dalla presenza (o da una diversa quantità) di una o più sostanze che favoriscono o ostacolano l'attività della proteasi o la sua resistenza a determinati agenti. Già ho detto come la questione non possa essere risolta che il giorno in cui si sarà trovato il modo di ottenere le proteasi batteriche e ifomicetiche allo stato di assoluta purezza.

Le conclusioni che si possono dedurre da questa terza serie di esperienze sono che la resistenza al calore delle proteasi batteriche e ifomicetiche contenute nei filtrati dei liquidi colturali varia da specie a specie e che in tali condizioni alcune proteasi (quella del carbonchio p. es.) resistono anche al riscaldamento a 80° per mezz'ora.

Interessanti sono i dati raccolti nella tabella 5^a relativa alla quantità di gelatina fluidificata (in uguali condizioni di temperatura, reazione, etc.) da quantità diverse di filtrato enzimatico posto a contatto con essa. Per quanto riguarda la gelatina mantenuta allo stato fluido e mischiata intimamente col liquido enzimatico, ricorderò che Malfitano (XIX) per la proteasi di *Asp. niger* ha trovato che il tempo impiegato per fluidificare la stessa quantità di gelatina della stessa preparazione, mantenuta a 35°, è in ragione inversa della quantità di proteasi adoperata (filtrato di una coltura in liquido di Raulin); invece secondo la legge di Schütz e Borissow il potere digestivo della tripsina sugli albuminoidi disciolti sarebbe proporzionale alla radice quadrata della quantità di tripsina. Per quello che riguarda la gelatina mantenuta allo stato solido e messa semplicemente a contatto col liquido enzimatico, ricorderò che dalle esperienze riportate da Fuhrmann (X, pag. 46-49) eseguite col metodo di Fermi, a 21°-23°, con filtrati di colture in gelatina (di dieci giorni) di *Bacterium panis viscosi* I Vogel, risulterebbe che a diluizioni forti del filtrato stesso la quantità di gelatina fluidificata è (con una certa approssimazione) direttamente proporzionale, a parità di tempo, alla quantità di enzima impiegato, e a parità di quantità enzimatica, al tempo di azione.

Le mie esperienze furono fatte col *V. cholerae* e *B. anthracis*, sia mischiando intimamente 2 cmc. di filtrato enzimatico con 8 cmc. di gelatina (gelatina 2^a per *V. cholerae*, 8^a per *B. anthracis*) fusa dal calore e poi lasciata risolidificare, sia mettendo il liquido semplicemente a contatto della gelatina solida (gelatina 3^a per *V. cholerae*, 6^a e 7^a per *B. anthracis*), e mantenendo in un caso e nell'altro a temperatura

Influenza della quantità e concentrazione del filtrato gelatinolitico.

da 23° a 25°, ciò che offre il vantaggio di poter constatare l'avvenuta fluidificazione della gelatina senza bisogno di ricorrere alla frequente immersione delle provette in acqua fredda. Quantunque le mie osservazioni non siano state fatte a intervalli frequentissimi e regolari (1), pure risulta da esse (sia pure in misura approssimativa) la stessa legge verificata da Malfitano per il filtrato di colture di *Asp. niger* mescolato con la gelatina, cioè del tempo inversamente proporzionale alla quantità di liquido enzimatico. Nell'altro caso invece, pur lasciando da parte le ricerche fatte aggiungendo quantità crescenti di filtrato (2) e limitandomi a quelle eseguite con quantità uguali (2 cmc.) di liquido enzimatico, contenente però la proteasi in quantità decrescenti (filtrato integro, oppure più o meno diluito con acqua distillata), risulta dalle mie tabelle non esser vera la legge della quantità di gelatina fluidificata direttamente proporzionale alla quantità di enzima adoperata (3), giacchè con quantità 1, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{3}$ di enzima (colonne: 2 cmc. di filtrato; 1 di filtrato + 1 d'acqua; 1 di filtrato + 2 d'acqua) la quantità della gelatina liquefatta invece di essere rispettivamente 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ è stata (anche dopo molti giorni di azione, quando la differenza si era più accentuata e le misure erano relativamente più esatte) all'incirca 1, $\frac{6}{7}$ a $\frac{3}{4}$, $\frac{5}{7}$ a $\frac{1}{2}$; dunque diminuendo l'enzima, la quantità di gelatina fusa è diminuita in misura molto più piccola. Che se invece di diluire con acqua distillata, si diluisce con brodo, allora la legge della proporzionalità diretta si verifica con molto maggiore approssimazione; ciò deve dipendere probabilmente dal fatto che in tal caso la diluizione è stata eseguita con un liquido che per la sua composizione si avvicinava molto a quella del liquido (filtrato di brodocolture) in cui si trovava disciolto l'enzima e così è restato uguale o quasi il quantitativo delle altre sostanze che accompagnano l'enzima e che possono, come già ho detto, influire notevolmente sulla sua attività.

Azione della formaldeide sulla gelatina fluidificata dalle gelatinasi.

Ho già detto che tutti gli Schizomiceti e Ifomiceti liquefacenti la gelatina da me esaminati (35 specie diverse), coltivati su terreni alla gelatina, finiscono per trasformar questa

(1) I dati delle tabelle sono troppo sintetici e non contengono tutte le osservazioni; il riportarle tutte avrebbe richiesto dei quadri più numerosi e più grandi.

(2) In questo caso la quantità di enzima che viene a contatto con la gelatina è sempre la stessa, almeno in principio; è solo in seguito, quando la gelatinolisi progredisce e per l'agitazione delle provette la gelatina fusa si mescola col filtrato, che la concentrazione dell'enzima nel liquido che ne risulta varia nelle diverse provette; è così che si spiega come in principio l'altezza dello strato di gelatina fusa sia uguale o quasi in tutte le provette e in seguito cresca nei tubi contenenti maggior quantità di filtrato.

(3) Vero è che Fuhrmann dice che essa è vera solo per forti diluizioni del liquido enzimatico, ma dall'esame delle tabelle da lui riportate a me sembra che tale legge (sia pure con questa limitazione) non risulti in modo chiaro; essa si verificherebbe solo per le prime due diluizioni e, anche per queste, solo per le due misure fatte dopo 4 e 8 giorni e non per quella fatta dopo 14 giorni; probabilmente quindi si tratta di un fatto fortuito o anche apparente (impossibilità di fare, specialmente per strati poco alti di gelatina fusa, delle misure esatte, in decimi di millimetro).

(in un tempo più o meno lungo a seconda delle condizioni più o meno favorevoli allo sviluppo del germe, alla produzione della gelatinasi, all'attività di questa etc.) in un prodotto non più risolidificabile dai vapori di formalina. Anche per i filtrati enzimatici delle specie da me studiate, agenti quindi in assenza delle cellule batteriche o ifomicetiche, si verifica la stessa cosa: la proteasi in essi contenuta attacca la molecola della gelatina facendo perdere a questa successivamente la proprietà di tornare solida a 15°, a 10°, a 0°, e infine ai vapori di formaldeide; la trasformazione si svolge presso a poco con le stesse variazioni già riscontrate per le colture e ritengo quindi inutile insistervi oltre e riferire tutte le osservazioni da me fatte in proposito.

*
* *

Le ricerche sulla azione delle proteasi batteriche e ifomicetiche in assenza dei germi che le hanno prodotte mi hanno permesso di chiarire un punto rimasto oscuro nelle mie precedenti esperienze (XXX), che cioè la gelatinolisi provocata dal *B. anthracis* si compia più rapidamente nelle colture a 22° che in quelle a 37°, che pure rappresenta la temperatura *optimum* per lo sviluppo del carbonchio. Restava il dubbio se ciò dipendesse dal fatto che a tale temperatura fosse meno intensa la eliminazione della proteasi da parte del germe o la attività gelatinolitica di questa proteasi. Come già ho accennato, da queste mie ulteriori ricerche è risultato (tabella 3^a) che, al pari degli altri filtrati, anche quello di brodocolture di carbonchio è molto più attivo a 37° che a 22°. Ho voluto quindi verificare se dalle brodocolture a basse temperature (20° a 28°) si ottenesse un filtrato più attivo di quello ricavato da brodocolture a 37°. I risultati di tutte le numerose ricerche eseguite in questo senso sono sparsi in tutte le tabelle (2^a, 3^a, 4^a e 5^a) e ci dicono che i filtrati di brodocolture di carbonchio a 37° si sono sempre mostrati meno attivi di quelli di brodocolture lasciate per lo stesso numero di giorni a 28°, a 26° e a 24°, e quasi altrettanto attivi di quelli di brodocolture a 20°. Tale minore attività gelatinolitica del filtrato di colture a 37° si è manifestata su tutte le varie specie di gelatina da me adoperate (tabella 2^a) (1), per tutte le temperature alle quali ho sperimentato (tabella 3^a), con tutti i filtrati scaldati o no per $\frac{1}{2}$ ora a temperature da 50° a 80° (tabella 4^a), per tutte le diluizioni fatte del filtrato con acqua distillata (tabella 5^a), insomma col variare di tutte le condizioni che influiscono sulla azione gelatinolitica dei filtrati attivi. *L'optimum di temperatura per la eliminazione della proteasi da parte del B. anthracis non pare dunque che coincida con l'optimum di sviluppo del bacillo stesso; aumentando la temperatura da 20° a 28°, il filtrato delle brodocolture di-*

*Produzione di proteasi.
Influenza della temperatura.*

(1) Sulla gelatina S^a, che è la più propizia all'esplicarsi della attività gelatinolitica, la differenza è stata molto più sensibile.

venta sempre più attivo; portandola a 37°, diventa meno attivo che a 28°, 26°, 24° e forse anche a 20°.

I risultati da me ottenuti col *B. anthracis* essendo contrari a quello che finora si sapeva o si supponeva per gli Schizomiceti e Ifomiceti in genere (1), ho voluto vedere se lo stesso fenomeno si ripetesse per altri germi aventi il loro optimum di sviluppo a 37° (*V. cholerae*, *Asp. effusus*, *Asp. fumigatus* etc.) e se per il *B. anthracis* esso fosse in rapporto col fatto, da me ripetutamente constatato, dell'intorbidamento che si verifica nel filtrato delle brodoculture a 37° di carbonchio (2), scaldato a 50°, 55°, 60° etc. Le esperienze non sono ancora ultimate, ma fin da ora posso dire che tanto i filtrati di brodo-culture di *V. cholerae* a 37°, quanto, e soprattutto, quelli di *Asp. effusus* e anche quelli *Asp. fumigatus* su liquido di Raulin, sono molto più attivi dei filtrati di colture a 26°; e siccome viceversa per *Asp. fumigatus* la produzione di tossici è più intensa a 26° che a 37°, parrebbe che, per questa muffa almeno, la produzione di tossici e la produzione di gelatinasi non procedano di pari passo col variare della temperatura. Dico: *parrebbe*, perchè potrebbe darsi benissimo che la maggiore attività del filtrato di colture a 37° dipendesse non dalla produzione di una maggior quantità di proteasi o dalla produzione di un enzima più attivo, ma semplicemente dal fatto che la reazione del liquido culturale diventa più presto e più decisamente alcalina.

Influenza della composizione del terreno culturale.

Ma oltre alla temperatura, altre condizioni influiscono sulla produzione degli enzimi da parte dei batteri e delle muffe; così è stato trovato che gli idrati di carbonio (i quali pure non ostacolano, ma anzi, come risulta dalle mie esperienze con *B. anthracis* e *Asp. effusus*, a volte favoriscono l'attività delle proteasi batteriche e ifomicetiche) ostacolano tutti più o meno la produzione di proteasi da parte dei bat-

(1) Per i batteri, non trovo nella letteratura da me consultata che alcuno si sia occupato, espressamente almeno, di tale questione, se ne eccettui Gage (XI) il quale però ha sperimentato con colture in gelatina (azione contemporanea della temperatura sulla produzione della gelatinasi e sulla attività di questa) e ha trovato che per la maggior parte delle 288 colture da lui esaminate la fluidificazione non è a 40° più rapida che a 20°. Fuhrmann (X, pag. 36) dice che molti batteri non si sviluppano bene a 22° e che perciò a questa temperatura producono una minore quantità di proteasi; Malfitano (XIX) dice che la temperatura non sembra abbia una influenza diretta sulla produzione di gelatinasi da parte di *Asp. niger*; secondo lui la comparsa dell'enzima nel liquido culturale sarebbe legata non alla vita ma alla morte delle cellule e così, mentre nelle colture a 25° (che si sono sviluppate e sporificate più presto ma il cui micelio si è meglio conservato) la proteasi nel liquido di coltura aumenterebbe lentamente, in quelle a 37° (sviluppo più lento ma più intenso e micelio scomposti presto) il liquido si arricchirebbe di proteasi all'atto del disfacciamento del micelio.

(2) Tale intorbidamento è avvenuto sempre nelle colture a 37° e in queste soltanto, e mai nelle altre a temperature più basse (da 28° in giù); esso inoltre non si è verificato mai nelle colture a 37° di *Asp. effusus* e di *V. cholerae*.

teri (1); altrettanto fanno i glucosidi e altre sostanze ancora (v. p. 4). Inoltre è stato affermato da vari autori e recentemente anche da Schmailowitsch (XXVII) (2) che i batteri sarebbero incapaci o quasi di eliminare delle proteasi in assenza di sostanze proteiche; ma già Fermi, il quale nel 1890 (VII) aveva concluso che su terreni privi di albumina i pochi batteri capaci di svilupparvisi non producevano proteasi, nel 1892 (VIII) dice che il *B. prodigiosus* e il *B. pyocyaneus* possono produrre gelatinasi in assenza di albumina, ma solo in presenza di glicerina o di mannite. Quanto agli Ifomiceti, la stessa affermazione della incapacità a dare proteasi in assenza di albumina era stata fatta da Bourquelot (IV) per *Asp. niger* e *Pen. glaucum* coltivati su liquido di Raulin, e poi confermata da Girard, da Duclaux e da Gravina (XII) per *P. glaucum*. Gravina anzi dice che dalle esperienze di Bourquelot e dalle sue risulta che il *Pen. glaucum* coltivato in certi mezzi di coltura può secernere fermenti proteolitici (tripsina se coltivato in gelatina, etc.) « cosa che non fu ancora constatata per altre muffe ». L'affermazione è troppo generica; riorderò qui che già dal 1900 Malfitano ha trovato che l'*Asp. niger* coltivato su liquido di Raulin elimina nel terreno di coltura una proteasi. Io pure ho trovato attivi sulla gelatina i filtrati di colture su liquido di Raulin, non solo di *Asp. niger* ma anche di *Asp. effusus*, *Asp. fumigatus*, *Pen. glaucum* etc.

Altre esperienze sono in corso per vedere se queste ed altre specie di Penicilli, Aspergilli, etc., capaci di fluidificare la gelatina, coltivate su liquido di Raulin diano tutte degli enzimi gelatinolitici, e per stabilire se tale proprietà si conservi o vada perduta con frequenti e numerosi trapianti su questo terreno colturale privo di albuminoidi, e se il potere gelatinolitico di filtrati di colture su liquido di Raulin peptonizzato sia superiore o uguale a quello di colture su liquido di Raulin ordinario. Resta intanto stabilito dalle mie ricerche

(1) Essi non impedirebbero però la produzione di gelatinasi da parte delle muffe; così almeno risulterebbe dalle esperienze di Schäffer (XXVI) eseguite su molti spergilli e Penicilli, da quelle di Malfitano (XXIX) su *Asp. niger* coltivato in liquido di Raulin (saccarosio 5 % circa) e dalle mie su *Asp. niger*, *effusus*, *fumigatus* etc., *Pen. glaucum* etc. coltivati su liquido di Raulin o su gelatine con saccarosio, glucosio, etc. (vedi quadro a pag. 21). Invece Stoll avrebbe trovato che il destrosio al 2 % impedisce la gelatinolisi nelle colture di *Pen. olivaceum*, *rubrum*, *brevicaule*, *italicum* e *purpureogenum* e permette solo una lenta fluidificazione (ritardata ancor di più da dosi più alte) nelle colture di *Pen. glaucum*. Ma a parte il fatto che nelle ricerche eseguite da Stoll non si può distinguere l'influenza esercitata dal destrosio sulla proteasi da quella esercitata sulla attività di questa, bisogna ricordare che Wehmer ha ottenuto la fluidificazione della gelatina per opera del *Pen. brevicaulis* nelle colture su gelatina al mosto di birra.

(2) Schmailowitsch, che ha sperimentato col *B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus*, *B. subtilis*, *V. cholerae*, *V. Finkler-Prior*, conclude che i microbi proteolitici e amilolitici non producono enzimi quando nel terreno nutritivo non si trovano sostanze che possano essere attaccate da questi enzimi. Ascoli (I, pag. 11) dice che i microrganismi a seconda del cibo loro offerto secernono gli enzimi adeguati, e cioè fermenti proteolitici se devono nutrirsi d'albumina e così via, di modo che l'azione enzimatica è sempre rispondente allo stimolo.

che gli Ifomiceti da me sperimentati sono capaci di eliminare una proteasi nel liquido colturale, non solo quando questo contiene idrati di carbonio (saccarosio 5%), ma anche quando non contiene affatto sostanze proteiche; la gelatinasi anzi si produce anche in contemporanea assenza di albuminoidi e presenza di zucchero. Probabilmente quindi il fatto riscontrato per gli Schizomiceti della incapacità e difficoltà di produrre gelatinasi in assenza di albuminoidi dipende dalla loro inattitudine a svilupparsi bene su terreni assolutamente privi di tali sostanze.

Un'ultima osservazione che si può fare esaminando i dati contenuti nelle mie tabelle è che l'attività gelatinolitica dei filtrati di colture di germi liquefacienti diminuisce col progredire della fluidificazione, pur restando costante la temperatura, e tanto più decresce quanto più progredisce la gelatinolisi (1); ciò accade non soltanto in quei casi in cui la reazione della gelatina è acida e quindi il liquido risultante dal miscuglio del filtrato enzimatico con la gelatina fusa assume una reazione acida (vedi tabella 2^a), ma anche quando la reazione della gelatina è alcalina, e tale si conserva sempre quella del liquido enzimatico; ciò può dipendere, sia dalla progressiva maggiore diluizione che subisce la proteasi contenuta nel filtrato, sia dalla presenza delle sostanze prodotte dalla reazione enzimatica stessa, sia da una eventuale attenuazione della proteasi etc.

(1) In altre parole, la legge che la quantità di gelatina fluidificata è direttamente proporzionale al tempo di azione della proteasi, si verifica nelle condizioni in cui io ho sperimentato più esattamente nei primi giorni che dopo molti giorni.

BIBLIOGRAFIA ⁽¹⁾

- I. Ascoli, *Rassegna di Bacterio - Opo - Sieroterapia*, vol. 3, fasc. 6-8 (1907).
- II. Bitter, *Archiv f. Hygiene*, Vol. 5, pag. 241 (1886).
- III. Bogoluboff, *Rousski Wratsch.*, 1907, pag. 259-263. [*Bullet. Inst. Pasteur*, 1907, pag. 429].
- IV. Bourquelot, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, Vol. 45, pag. 425 (1893).
- V. Charasow, *Ibidem*, 1905, n° 19. [*Biochem. Centralbl.*, Vol. IV, pag. 268].
- VI. De Waele e Vandevelde, *Centralblatt f. Bakter.*, 1^a, Orig. Vol. 39, pag. 353 (1905).

(1) In questo elenco sono raccolte soltanto quelle pubblicazioni che ho citato nel testo e che più specialmente si riferiscono agli argomenti da me trattati; per tutte le altre pubblicazioni sugli enzimi batterici rinvio il lettore al bel libro del Dott. Fuhrmann, qui citato e per gli altri enzimi (Blastomiceti, Saccaromiceti, Mucorinee, Ifomiceti) al trattato di Lafar (v. p. 22).

- VII. **Fermi**, *Archiv f. Hygiene*, Vol. 10, pag. 1 (1890).
- VIII. **Fermi**, *Ibidem*, Vol. 14 pag. 1 (1892).
- IX. **Fermi**, *Ibidem*, Vol. 55, pag. 140-205 (1906).
- X. **Fuhrmann**, *Vorlesungen über Bakterienenzyme*, Iena, 1907.
- XI. **Gage**, *Associaz. americana d'igiene pubblica*, 3 Dic. 1906 [*Bullet. Inst. Pasteur*, 1907, pag. 146].
- XII. **Gravina**, *Rivista pellagologica italiana*, Vol. 6, pag. 57 e vol. 7 pag. 6.
- XIII. **Haffkine**, *Bulletin de l'Institut Pasteur*, Vol. , pag. 699 (1906).
- XIV. **Hansen**, *Flora*, Vol. 72, pag. 88 (1889).
- XV. **Iodlbauer**, *Biochem. Zeitschrift*, Vol. 3, pag. 488-502 (1907).
- XVI. **Jordan**, *Biolog. Studies etc.* [*Bullet. Inst. Pasteur*, 1907, pag. 223].
- XVII. **Lasca**, *Milchwirtsch. Centralblatt*, vol. 3^e, n° 5 (1907).
- XXVIII. **Liborius**, *Zeitschrift f. Hygiene*, Vol. I, pag. 156 (1886).
- XIX **Malfitano**, *Annales de l'Institut Pasteur*, Vol. 14, pag. 60 e 420 (1900).
- XX **Malfitano**, *Compt. rend. de la Société de biologie*, 1905.
- XXI. **Mavrojannis**, *Zeitschrift f. Hygiene*, Vol. 45, pag. 108-114 (1903).
- XXII. **Mavrojannis**, *Journal de physiol. et de pathol. gén.*, vol. 6, pag. 273 (1904).
- XXIII. **Panc**, *Riforma medica*, vol. 21, pag. 1263 (1905).
- XXIV. **Petruschewsky**, *Zeitschr. f. phys. Chemie*, Vol. 50, pag. 250-262 (1907).
- XXV. **Price**, *U. S. Depart. Agric., Bureau Anim. Ind., Circ.*, 59.
- XXVI. **Schäffer**, *Dissert.*, Erlangen, 1901, pag. 15.
- XXVII. **Schmailovitsch**, *Wratschebnaja Gazetta*, 1902, pag. 52 [*Biochem. Centralbl.*, vol. 1^e, pag. 230].
- XXVIII. **Schouten**, *Centralbl. f. Bakter.*, 2^a, vol. 18, pag. 94 (1907).
- XXIX. **Stoll**, *Dissert.*, Würzburg, 1904.
- XXX. **Tiraboschi**, *Annali Igiene sperimentale* 1905, pag. 429-451.
- XXXI. **Tiraboschi**, *Terzo congresso pellagrol. ital.*, 1906.
- XXXII. **Tiraboschi**, *Policlinico*, sezione pratica, 1908.
- XXXIII. **Vandavelde**, *Biochem. Zeitschrift*, vol. 3^e, pag. 315 (1907).
- XXXIV. **Wehmer**, *Chemiker-Zeitung*, Vol. 19, pag. 2038 (1895). [*Centr. f. Bakter.*, 2^a, 1896, pag. 92].
- XXXV. **Wehmer**, *Société de physique etc. de Genève*, vol. 33, parte 2^a (1901).
- XXXVI. **Wehmer**, *Handbuch der technischen Mykologie* (Lafar), vol. 4^e, pag. 239-260 (1906).

(Vedi a pagg. segg. le tabelle).

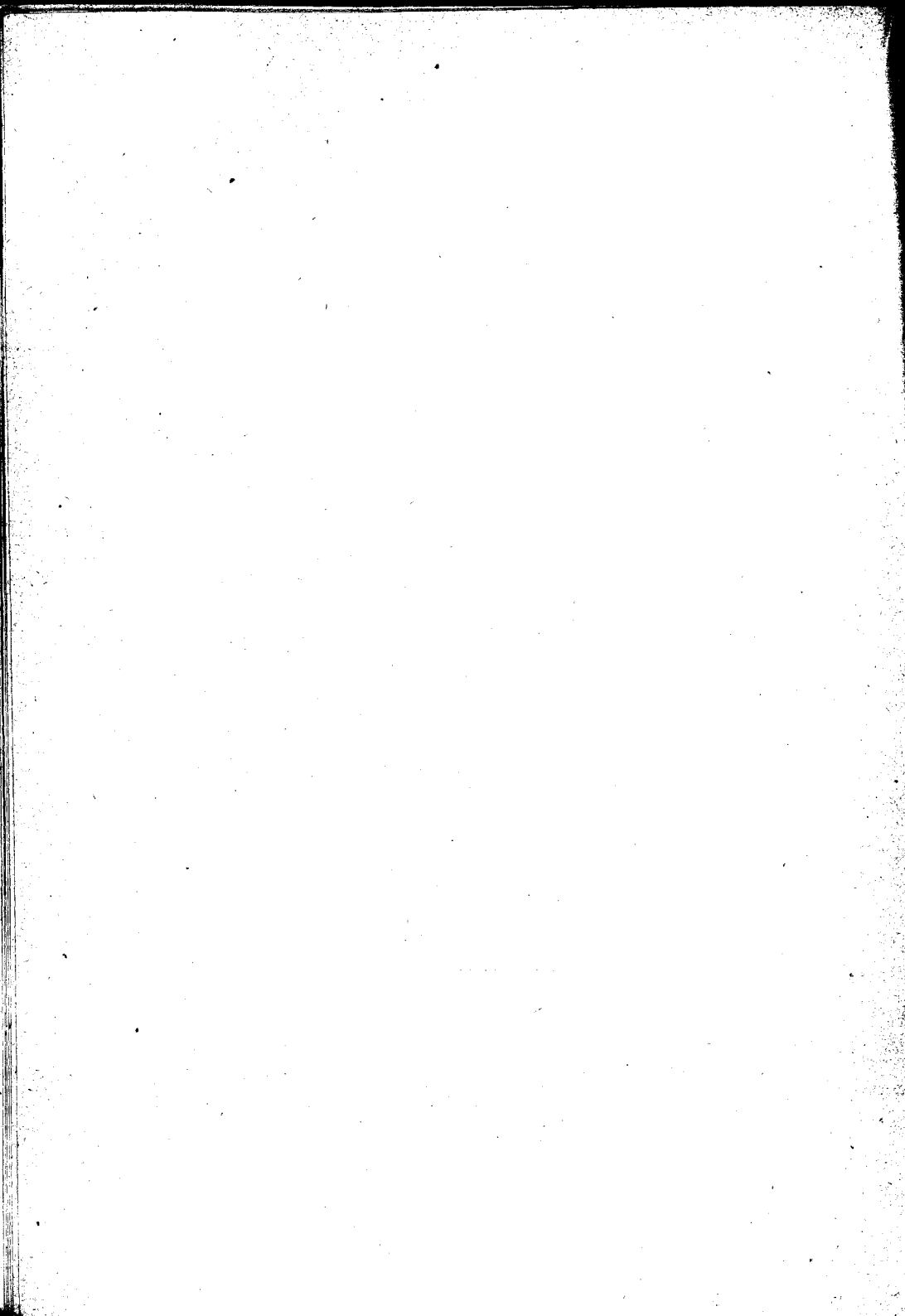


Tabella 1^a

Varie specie di terreni a base di gelatina adoperati nello studio della azione gelatinolitica esercitata dal filtrato di colture di microrganismi diversi.

- Gelatina 1^a — Acqua distillata + gelatina 10 %. Reazione acida.
Punto di fusione vicino a 30° C.
- » 2^a — Acqua distillata + gelatina 10 %. Reazione alcalina.
Punto di fusione vicino a 30° C.
 - » 3^a — Acqua distillata + gelatina 10 % + Na Cl 0,5 %.
Reazione alcalina. Punto di fusione vicino a 30° C.
 - » 4^a — Acqua distillata + gelatina 10 % + saccarosio 3 %.
Reazione acida. Punto di fusione vicino a 30° C.
 - » 5^a — Acqua distillata + gelatina 10% + Na Cl 0,5 % +
saccarosio 3 %. Reazione acida. Punto di fusione
vicino a 30° C.
 - » 6^a — Acqua distillata + gelatina 10 % + Na Cl 0,5 % +
saccarosio 6%. Reazione acida. Punto di fusione
vicino a 30° C.
 - » 7^a — Acqua distillata + gelatina 10% + saccarosio 3 %
+ acido tartarico 0,3 % + nitrato di ammonio
0,3 %. Reazione acida. Punto di fusione vicino a
30° C.
 - » 8^a — Infuso di carne + gelatina 12% + peptone 1 % +
Na Cl 0,5 %. Reazione alcalina. Punto di fusione
vicino a 27° C.

Tabella 2^a

Altezza (in mm.) dello strato di gelatina fluidificata (in svariati terreni alla gelatina)
da filtrati di colture di microrganismi diversi

COLTURA	Giorni di azione della gelatina	Temperatura	Varie specie di terreni nutritivi a base di gelatina									
			1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*		
Vibrio cholerae Brodcultura di 4 giorni a 37° C., filtrata attraverso il canale di Berkefeld, addizione di timolo nella proporzione di 2 ogo e aggiunta nella quantità di 2 enc. per ogni tubo di gelatina; reazione del filtrato: alcalina. (1)	2	23°	1-2	3-4	4	2	3-4	3-4	3-4	4-5		
	3	"	2-3	5-6	5 1/2-6	3	5-6	5-6	5-6	6-8		
	4	"	3-3 1/2	6-7	8 1/2	4 1/2-5	7-8	7-8	8	9-10		
	5	"	4-5	7-8	8 1/2	5-6	9-9 1/2	8-9	9-10	11-12		
	6	"	5-6	8 1/2-9 1/2	10 1/2	6 1/2	10 1/2-11	9 1/2-10	11	13-14 1/2		
	18	"	13	21	23	15	21 1/2	22	27	35 1/2		
Bacillus anthracis. Brodculture di 4 giorni a 37° (come a) e a 36° (come b); filtrate e aggiunte come sopra; reazione del filtrato: alcalina.	2	20°-22°	1-2	3-4	4	2	3-4	3-4	3-4	4-5		
	3	"	2-3	5-6	5 1/2-6	3	5-6	5-6	5-6	6-8		
	4	"	3-3 1/2	6-7	8 1/2	4 1/2-5	7-8	7-8	8	9-10		
	5	"	4-5	7-8	8 1/2	5-6	9-9 1/2	8-9	9-10	11-12		
	6	"	5-6	8 1/2-9 1/2	10 1/2	6 1/2	10 1/2-11	9 1/2-10	11	13-14 1/2		
	15	"	13	21	23	15	21 1/2	22	27	35 1/2		
Aspergillus effusus Tirab. Colture in liquido di Raulin a 36° per 6 giorni (colonne a) e a 36° per 7 giorni (colonne b); filtrate e aggiunte come sopra; reazione del filtrato: alcalina. (2)	2	23°	1-2	3-4	4	2	3-4	3-4	3-4	4-5		
	3	"	2-3	5-6	5 1/2-6	3	5-6	5-6	5-6	6-8		
	4	"	3-3 1/2	6-7	8 1/2	4 1/2-5	7-8	7-8	8	9-10		
	5	"	4-5	7-8	8 1/2	5-6	9-9 1/2	8-9	9-10	11-12		
	6	"	5-6	8 1/2-9 1/2	10 1/2	6 1/2	10 1/2-11	9 1/2-10	11	13-14 1/2		
	15	"	13	21	23	15	21 1/2	22	27	35 1/2		
	20	"	16	23	30	19	30	2 1/2	34	44		
	23	"	20	35-36	40	23	30	2 1/2	46	?		
	31	"	20	35-36	40	23	30	2 1/2	46	?		
	31	"	20	35-36	40	23	30	2 1/2	46	?		
	31	"	20	35-36	40	23	30	2 1/2	46	?		
	31	"	20	35-36	40	23	30	2 1/2	46	?		

(1) Nelle gelatine 2*, 3*, 8* la reazione del miscuglio (filtrato o gelatina liquefatta) si conservò sempre alcalina, nelle altre divenne anfolera dopo 5-7 giorni e acida dopo 15-30 giorni.
(2) Anche qui nelle gelatine 2*, 3*, 8* la reazione si conservò alcalina, mentre nelle altre diventò anfolera dopo 3 giorni e acida dopo 4-8 giorni.

Tabella 3^{ta}

Tabella 3^{ta}

(Segue Tabella 3^a)

COLTURA	Durata di azione della gelatina nasali	Non miscchiato filtrato con gelatina 8						Filtrato enzimatico miscchiato con la gelatina 8 ^a									
		10°-14°			20°-22°			10°-14°		20°-22°		37°		45°-48°			
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b		
Bacillus anthracis	7 h.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	22 h.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	31 h.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	2 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	3 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	4 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	6 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	8 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	10 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	15 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	18 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	26 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	30 g.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Il miscuglio del filtrato con la gelatina è stato fatto nelle stesse proporzioni indicate sopra.		Per i primi 20 giorni in cui la temperatura resta a 10°-13° non si osserva nessun accenno di fluidificazione; poi la temperatura sale a 12°-14° e fluidifica; a 15°-18° e così la gelatina prima si rammolisce e dopo 2 mesi è tutta fluidificata ma esposta ai vapori di formaldeide torna solida.															
		Per i primi 20 giorni in cui la temperatura resta a 10°-13° non si osserva nessun accenno di fluidificazione; poi la temperatura sale a 12°-14° e fluidifica; a 15°-18° e così la gelatina prima si rammolisce e dopo 2 mesi è tutta fluidificata ma esposta ai vapori di formaldeide torna solida.															

(1) Dopo 15 g. la temperatura è salita a 12-14° C.

(2) Esposta ai vapori di formaldeide resta fluida.

COLTURA	Durata di azione della gelatina	Filtrato non misciato con gelatina 3 ^a		Filtrato misciato con gelatina 7 ^a			
		10 ^a -13 ^a	23 ^a	10 ^a -12 ^a	23 ^a	37 ^a	45 ^a
Aspergillus effusus Tirab.	6 h.	—	—	—	solida a 10 ^a	solida a 0 ^a	quasi fluida a 0 ^a
	10 h.	—	—	—	solida a 0 ^a	fluida a 0 ^a	fluida a 0 ^a
Filtrato della coltura in liquido di Raulin a 30° per 7 giorni, di cui alla tabella 2 ^a .	1 g.	—	1-2	—	fluida a 10 ^a	{ esp. sia ai vapori di formalina resta fluida }	{ esp. sia ai vapori di formalina resta fluida }
	2 g.	—	4	rammollita	risolidificata dai vapori di formalina		
Miscuglio del filtrato con la gelatina 7 ^a nelle solite porzioni.	3 g.	—	5-6	fluida	?	{ esp. sia ai vapori di formalina resta fluida }	{ esp. sia ai vapori di formalina resta fluida }
	4 g.	—	7+	fluida a 0 ^a	?		
	5 g.	—	9-	*	{ esp. sia ai vapori di formalina resta fluida }		
	11 g.	3-	17-	visolidificata da formaldeide			

Tabella 4^a

Altezza (in mm) dello strato di gelatina fluidificata da filtrati di colture portati per $\frac{1}{2}$ ora ad alte temperature.

Durata d'azione	Tempe- ratura	Filtrato di coltura di 4 giorni con gelatina 2 ^a					Filtrato di coltura di 3 giorni con gelatina 8 ^a				
		50°	60°	70°	80°	—	50°	55°	60°	65°	70°
		3	1	—	—	3	5	4-5	4	2	—
Vibrio cholerae Filtrati delle brodoculture a 37° di 4 giorni (di cui alla tabella 2 ^a) e di 3 giorni (di cui alla tabella 5 ^a) aggiunti alle gelatine 2 ^a e 8 ^a .	20°	4-5	2-3	—	—	5	6-8	7+	6	4+	—
	"	6+	4	—	—	6-7	9-10	9-10	8	5	—
	"	8½	5+	—	—	9	13-14	13-14	12	7+	1
	"	11	7½	—	—	11-12	16-18	17+	15	9-10	1-2
	"	13-14	9½	—	—	13-14	19-21	20-21	18-19	11-12	2½
	25°	15-16	11½	—	—	15-16	23-24	24-25	22	14	5
	"	20½	16+	—	—	20-21	33-35	34-35	31	21	9½
	"	30½	25	—	—	32	51	51	48	31-32	45
	"										
	"										
Bacillus anthracis Filtrati delle brodoculture a 37° e 26° (di cui alla tabella 2 ^a), aggiunti alla gelatina 2 ^a	20°-22°	2-3	2-3	1-2	—	2½	—	—	—	—	—
	"	3-4	3-4	2½	—	3½	4+	1+	—	—	—
	"	4+	4+	3	—	4+	2-3	1-2	1+	1-2	1
	"	6+	6+	5	—	6	4	3+	3+	3+	4
	"	8	8	8	1-2	8½	6+	6	6	6	6-7
	"	10	10	9½	3-4	11+	8+	7½	7½	7+	3+
	"	15	17	18	14-15	17	13+	13	12½	13	5
	"										
	"										
	"										
		Filtrato di coltura di 5 g. a 26°					Filtrato di coltura di 5 g. a 37°				
		50°	55°	60°	65°	70°	50°	55°	60°	65°	70°
Bacillus anthracis Filtrati delle brodoculture a 37° e 26° (di cui alla tabella 2 ^a), aggiunti alla gelatina 2 ^a	3 g.	2-3	2-3	2-3	1-2	—	—	—	—	—	—
	4	3-4	3-4	4	2½	—	4+	1+	—	—	—
	5	4+	4+	5	3	—	2-3	1-2	1+	1-2	1
	6	6+	6+	6½	5	—	4	3+	3+	3+	4
	8	8	8	8	8	1-2	6+	6	6	6	6-7
	10	10	11½	10	9½	3-4	8+	7½	7½	7+	3+
	15	17	17	18	14-15	8-9	13+	13	12½	13	5
	"										
	"										
	"										

Durata di azione della proteasi		Temperatura		Filtrato di coltura di 5 g. a 26°									
				Aspergillus effusus Trab.									
				Filtrato della coltura in liquido di rautin a 35° per 6 giorni (di cui alla tabella 2 ^a , aggiunto alla gelatina 7 ^a).									
				2 g.		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a	
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
h. 24	25-28°			5-7	5-6	1	1	10-11	9	1	1	17-18	16-17
h. 62	25°			10-11	9	2	2	18-19	15	3-5	1	27-29	23-24
10	"			27-29	23-24	8-10	5	36-38	30-31	11-12	5-6	45-46	37-38
11	"			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
45	15-18°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
46	23°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
49	25°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38

Durata di azione della proteasi		Temperatura		Filtrato di coltura di 5 g. a 26°									
				Aspergillus effusus Trab.									
				Filtrato della coltura in liquido di rautin a 35° per 6 giorni (di cui alla tabella 2 ^a , aggiunto alla gelatina 7 ^a).									
				2 g.		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a	
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
h. 24	25-28°			5-7	5-6	1	1	10-11	9	1	1	17-18	16-17
h. 62	25°			10-11	9	2	2	18-19	15	3-5	1	27-29	23-24
10	"			27-29	23-24	8-10	5	36-38	30-31	11-12	5-6	45-46	37-38
11	"			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
45	15-18°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
46	23°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
49	25°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38

Durata di azione della proteasi		Temperatura		Filtrato di coltura di 5 g. a 26°									
				Aspergillus effusus Trab.									
				Filtrato della coltura in liquido di rautin a 35° per 6 giorni (di cui alla tabella 2 ^a , aggiunto alla gelatina 7 ^a).									
				2 g.		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a	
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
h. 24	25-28°			5-7	5-6	1	1	10-11	9	1	1	17-18	16-17
h. 62	25°			10-11	9	2	2	18-19	15	3-5	1	27-29	23-24
10	"			27-29	23-24	8-10	5	36-38	30-31	11-12	5-6	45-46	37-38
11	"			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
45	15-18°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
46	23°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
49	25°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38

Filtrati di colture di 4 giorni di *Bacillus anthracis* riscaldati per 15 ore a 65°-80° e aggiunti a gelatina 8^a

Durata di azione della proteasi		Temperatura		Filtrato di coltura di 5 g. a 26°									
				Aspergillus effusus Trab.									
				Filtrato della coltura in liquido di rautin a 35° per 6 giorni (di cui alla tabella 2 ^a , aggiunto alla gelatina 7 ^a).									
				2 g.		2 ^a		3 ^a		4 ^a		5 ^a	
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
h. 24	25-28°			5-7	5-6	1	1	10-11	9	1	1	17-18	16-17
h. 62	25°			10-11	9	2	2	18-19	15	3-5	1	27-29	23-24
10	"			27-29	23-24	8-10	5	36-38	30-31	11-12	5-6	45-46	37-38
11	"			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
45	15-18°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
46	23°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38
49	25°			45	37	11-12	5-6	45-46	37-38	11-12	5-6	45-46	37-38

Tabella 5.^a

Altezza (in mm) dello strato di gelatina fluidificata da quantità diverse di filtrato enzimatico.

A. Filtrato di brodocoltura, a 37° per 3 g.^{mi} di *Vibrio cholerae*, addizionato di timolo e agg.^{to} a cmc. 8 di gelatina 3^a, 2^a

Durata di azione	Temperatura	Gelatina 3 ^a , non miscchiata col filtrato.					Gelatina 3 ^a , miscchiata	
		2 cmc.	3 cmc.	4 cmc.	5 cmc.	6 cmc.	2 cmc.	4 cmc.
giorni 1	23°	2	2	2	2	2	torna solida a 0°	resta fluida a 0°
2	"	4 1/2-5	4 1/2-5	4 1/2	4 1/2	5	"	esposta ai vapori di formalina torna solida.
4	"	7-8	8	8-	8	9-	fluida a 0°	"
6	"	10-11	11	11+	11+	12	esposta ai vapori di formalina torna solida.	?
8	"	13	13-14	14-	14+	15	"	?
10	"	15	15-16	16+	16+	17	?	?
12	23°	17-18	18+	19-	19 1/2	20+	?	?
15	"	23	23-24	24 1/2	25+	27-	esposta ai vapori di formalina resta fluida.	esposta ai vapori di formalina resta fluida.
26	"	31-32	33-35	36 1/2	38	40		

(Segue Tabella 5a)

B. Filtrato di brodoculture, di 4 giorni a 20°, 24°, 28° e 37°, di *Bacillus anthracis* aggiunto a gelatina 7^a, senza mischiare; le colonne a, b, c, d, corrispondono rispettivamente ai filtrati delle colture a 20°, 24°, 28°, 37°.

Giorni	Tempe- ratura	1 cmc. di filtrato				2 cmc. di filtrato				4 cmc. di filtrato				1 cmc. filtrato + 1 acqua dist.				1 cmc. filtrato + 2 acqua dist. (della diluizione aggiunti 2 cmc.)			
		a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
1	25°-28°	5	6	5-7	4+	5	5-7	5-6	5-	5-6	5-	5-7	5-6	3-5	5-	5-6	5-	4-	4-5	4-5 1/2	4-
2-3	25°	9	10	10+	7 1/2	9	10-11	10	8-	10	10-	10-11	10	7-8	8 1/2	9	8-	7	7-8	8-	8 1/2
6	"	13 1/2	15	16	12	14 1/2	15-17	15	13 1/2	16	17-	17 1/2	15+	12-13	13 1/2	14	12 1/2	11	12	12 1/2	10 1/2
10	"	20	22-23	23+	18	24	25	24	21	26	27	27	24	18-19	20+	21	19	17	19	19	16
14	"	24	25	26	23 1/2	25-26	26	25	22	32	32 1/2	32 1/2	31	27	27	27	24 1/2	22	25	24 1/2	21
45	15°-18°	38 1/2	38	38	34	38	38	38	32	39	42	44	37	28	32	33	33 1/2	27	30	33 1/2	27
46	23°	37	41-42	43	34	37	38	37	32	39	42	44	37	28	32	33	33 1/2	27	30	33 1/2	27
49	25°	37	41-42	43	34	37	38	37	32	39	42	44	37	28	32	33	33 1/2	27	30	33 1/2	27

C. Filtrato di brodoculture, di 4 giorni a 23°, 27° e 37° di *Bacillus anthracis*; le colonne a, b, corrispondono rispettivamente alle colture a 27° e 37°.

Durata d'azione	Tempe- ratura	Filtrato della coltura a 39° non mischiato con gelatina										Filtrato delle colture a 27° e 37°, mischiato con 8 cmc. di gelatina 8°.									
		1 cmc.	2 cmc.	4 cmc.	1+1 H ₂ O	1+2 H ₂ O	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	1+5 brodo (1)	1+6 brodo (1)	1+7 brodo (1)	1 cmc. filtrato		2 cmc. filtrato		3 cmc. filtrato					
7 h.	25°-27°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	a	b	a	b	a	b		
1 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
2 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
3 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
4 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 brodo (1)	—	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°	torna solida a 10°		
7-8 g.	25°	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1+2 brodo (1)	1+3 brodo (1)	1+4 bro								

(1) Delle diverse diluizioni si sono aggiunti nei tubi di gelatina sempre 2 cmc.



