

Studio critico sui metodi per la ricerca del gruppo *Coli-aerogenes* nel latte

Dott. P. RENCO

(Ricevuto il 28 Maggio 1941-XIX)

PRESENZA ED ORIGINE DEL GRUPPO COLI-AEROGENES NEL LATTE

Al gruppo *Coli-aerogenes* appartiene quella numerosa schiera di schizomiceti a forma di bastoncino, mobili od immobili, Gram-negativi, asporigeni, non cromogeni, aerobi facoltativi che fermentano glucosio e lattosio con produzione di acidità e di gas.

La loro presenza nel latte crudo del mercato è indiscutibile sia questo destinato all'uso industriale o all'alimentazione.

Nella classificazione di Bergey (6) i microbi del gruppo *Coli-aerogenes* sono compresi nella famiglia delle *Bacteriaceae* sotto i generi *Escherichia* ed *Aerobacter*.

Escherichia. Bastoncini mobili ed immobili che si riscontrano comunemente nell'intestino di animali normali. Attaccano numerosi idrati di carbonio con formazione di acidi e frequentemente di acidi e gas. Non producono acetilmetilcarbinolo. Vi appartengono 29 specie.

Aerobacter. Bastoncini mobili od immobili comunemente presenti nell'intestino di animali normali. Producono acetilmetilcarbinolo. Vi appartengono 6 specie.

Assai comune e particolarmente adottata nel campo lattiero è la distinzione in *Bac. coli* (o anche *Escherichia coli*) e in *Bact. aerogenes* (od anche *Aerobacter aerogenes*) con tutti i numerosi ceppi tipici od atipici comprendenti anche i termini di passaggio tra l'uno e l'altro. Detta distinzione ha un particolare valore dal punto di vista igienico inquantochè il *Bac. coli* viene considerato come un germe di origine prettamente fecale, mentre il *Bact. aerogenes* nelle feci si riscontra assai di rado.

La loro presenza è indiscutibile nel latte crudo del mercato in qualsiasi modo esso venga prodotto, ma il loro numero varia assai con il modo di produzione e di conservazione e assume un valore alquanto diverso secondo se è considerato dal punto di vista igienico o da quello tecnologico della trasformazione del latte.

Gli igienisti tengono conto soltanto del *Bac. coli* come germe fecale, talvolta patogeno e talvolta presumibilmente accompagnato dagli altri germi patogeni dell'intestino.

Sono stati dimostrati come causa del catarro e delle diarree intestinali ceppi del *Bac. coli* ingeriti con il latte crudo (Gaffky (24), Abraham (1) ed altri.

Per le trasformazioni del latte la differenza tra il *Bac. coli* e *Bact. aero-genes* non ha importanza, perchè ambedue, se presenti in notevoli quantità, risultano assai dannosi. Possono essere causa del latte filante, dei sapori anormali del latte, del burro e del formaggio, ma soprattutto possono dar luogo al gonfiore del formaggio.

La provenienza del *Coli-aerogenes* nel latte può essere di varia origine, ma dipende quasi totalmente dal modo come è stata eseguita la mungitura ed i successivi trattamenti del latte, inquantochè il latte contenuto nella mammella non contiene quasi mai detti microbi. Le particelle fecali attaccate alla mammella od alle mani del mungitore, le squame e i peli della vacca, la lettiera, il foraggio, il pulviscolo atmosferico, le mosche, i filtri e i recipienti possono portare nel latte quantità più o meno forti dei microbi del gruppo *Coli-aerogenes*.

METODI DI RICERCA QUANTITATIVA DEL GRUPPO COLI-AEROGENES NEL LATTE

Tenuto conto della costante presenza del gruppo *Coli-aerogenes* nel latte, della sua origine e della sua importanza, appare logica la ricerca di un metodo per determinare rapidamente ed in modo semplice il suo contenuto nel latte. Perchè il numero del *Coli-aerogenes* può presentare un buon indizio della entità di inquinamento, cioè del grado di pulizia e del modo di conservazione.

Perciò numerosi sono i metodi proposti in merito, molti dei quali hanno avuto origine da quelli usati per la ricerca del *Coli-aerogenes* nell'acqua (nella quale detti germi assumono un'importanza assai diversa che non nel latte), ma nessuno si può dire abbia avuto sin ora consensi unanimi da coloro che li sperimentarono. Si è creduto perciò opportuno di passarli in rivista vagliando il loro valore in base ai risultati ottenuti dalle numerose ricerche condotte in merito. Tenendo conto dei principi sui quali si basano, i metodi possono dividersi come segue:

1) Metodi nei quali ad un esame preliminare segue un esame di conferma. L'esame preliminare si basa sull'acidificazione e sullo sviluppo di gas nel brodo lattosato, mentre quello di conferma sullo sviluppo di colonie caratteristiche sui mezzi nutritivi solidi (per es. agar di Endo), sul comportamento nella gelatina e sulla colorazione di Gram. Vi appartiene il metodo standard americano per la ricerca del *Bac. coli* nelle acque e il metodo di Neri e Simonetti (63).

2) Metodi che si basano sui terreni resi selettivi con aggiunta di bile o di sali biliari. Tali sono i terreni di Mc. Conckey (60) e Pegallac (49) ai quali viene aggiunta la bile e quelli di Chalmers (11) e Leifson (50) che contengono sali biliari.

3) Metodi che si basano sui terreni resi selettivi con aggiunta di colori di anilina od altre sostanze coloranti accompagnati o no da bile; questi sono i più numerosi e più diffusi. Vi appartengono:

Brodo bile lattosio verde brillante (78)

Brodo bleu di metilene bromocresolporpora (14)

Brodo lattosio cristalvioletto (79)
Brodo lattosio violetto di genziana (80) Brodo
bile lattosio violetto di genziana (39)
Brodo lattosio bile fucsina bleu di bromotimolo (90)
Brodo lattosio verde di malachite al bromotimolo (90)
Agar eosina bleu di metilene (79)
Agar bile rosso violetto (56) ·
Agar di Endo (51)
Brodo tripaflavina (38, 12)
Agar tripaflavina I. (38, 12)
Agar tripaflavina bleu di bromotimolo II. (38, 12) ·

4) Metodi che si basano sul viraggio del rosso neutro in giallo con la fluorescenza verde. Vi fanno parte i brodo rosso neutro, brodo glucosio rosso neutro (81) e il brodo glucosio-bile-rosso neutro (67).

5) Metodi che si basano sull'azione selettiva di formiati e ricinoleati. Sono i più recenti. Vi fanno parte:

agar citrato ricinoleato di Littmann e Stark (43)
brodo formiato ricinoleato di Stark e England (71) ·
agar formiato ricinoleato bleu di metilene rosso neutro di
Bartram e Black (2).

6) Ricerca dell'indolo.

La quantità di Coli-aerogenes per cc. si esprime con la media aritmetica delle colonie, quando vengono usati terreni agarizzati, mentre per terreni liquidi, col numero della diluizione massima che ha dato il risultato positivo.

Assai usate sono per i terreni liquidi le tabelle di Mc. Grady (61) che, se pure non perfette (58), rispondono abbastanza bene allo scopo anche quando vengono usate solamente due provette per ogni diluizione.

1. – *Metodi di arricchimento con prova di conferma.*

Molti A.A. hanno cercato di applicare al latte i metodi per la ricerca del gruppo Coli-aerogenes nelle acque, ma spesso con risultati poco soddisfacenti. Così è stato oggi quasi completamente abbandonato per il latte il metodo standard americano per la ricerca del Coli nelle acque. Il metodo consiste nella semina delle varie diluizioni del latte nel brodo lattosato distribuito nelle provette Durham. Dopo 24-28 ore a 37°C il materiale delle provette contenenti il gas viene seminato sull'agar di Endo, oppure sull'agar bleu di metilene e eosina. Le colonie caratteristiche vengono nuovamente seminate nel brodo lattosato, quindi le provette che presentano formazione di gas, vengono sottoposte ad esame microscopico previa colorazione di Gram. Le provette che contengono germi Gram-negativi ed asporigeni sono tenute come positive per il Bac. coli. Il metodo oltre ad essere lungo non risponde sempre bene perchè gli aerobi sporigeni e i fermenti lattici possono talora ostacolare lo sviluppo del Coli-aerogenes.

Infatti Farrell (18) afferma di aver riscontrato nel controllo del latte crudo (66 campioni) cifre di *Coli-aerogenes* nettamente inferiori con il brodo

lattosato (con o senza tampone) rispetto al brodo lattosio bile verde brillante, brodo lattosio fucsina e brodo bromocresolporpora bleu di metilene. Anche Mc Crady e Archambault (54) hanno trovato, per il latte crudo e pastorizzato, il brodo lattosato inferiore al brodo lattosio bile verde brillante. Invece Gunsalus e Stark (23) ritengono, per l'esame del latte pastorizzato, l'arricchimento in brodo lattosato tamponato o non tamponato con fosfati e successivo trapianto in brodo ricinoleato formiato, ugualmente buono al brodo lattosio bile verde brillante e alla diretta ricerca con brodo ricinoleato formiato. Non è escluso che a questi risultati contribuisca lo scarso numero dei fermenti lattici presenti nel latte pastorizzato.

Il metodo di Neri (63) si basa sulla acidificazione del brodo lattosato in presenza di rosso fenolo che serve come indicatore per il pH. Le provette acidificate, dopo la permanenza di 18 ore a 37°C, si sottopongono all'esame di conferma. Vengono dichiarate positive per il Bac. coli quelle contenenti germi Gram negativi non sporigeni e non fluidificanti la gelatina.

Secondo Lepanto (52) e Gabbano (25) il metodo risponde assai bene; bisogna però tenere presente ciò che si è detto sopra in merito al metodo standard americano. Anche la fluidificazione della gelatina ha valore relativo inquantochè Demeter e Sauer (12) e Johnson e Levine (32) hanno riscontrato ceppi del Coli-aerogenes liquefacenti.

2. - Terreni nutritivi a base di bile e sali biliari.

I metodi nei quali vengono adoperati i terreni nutritivi contenenti bile o sali biliari si basano sulla proprietà di questi ultimi e della bile stessa di ostacolare lo sviluppo di alcuni germi presenti nel latte capaci di dare false reazioni positive oppure di pregiudicare lo sviluppo del Coli-aerogenes nel latte. (Van der Reis (82), Leifson (50) ed altri). La bile viene generalmente aggiunta da 3.5 % al brodo lattosato (in presenza di un indicatore di acidità), versato nei tubi di fermentazione, per continuare lo sviluppo di gas. La selettività dei terreni nutritivi a base di bile e di sali biliari è però in genere alquanto relativa. Mc Grady e Archambault (54) affermano che sull'agar aggiunto di sali biliari soltanto circa 33 % di colonie tipiche risultano realmente appartenenti al Coli-aerogenes. Anche Lerner (49) afferma che il metodo di Pegallac risulta inferiore alla stessa ricerca dell'indolo. Pure il terreno di Mc. Conckey è secondo Farrell (18) notevolmente inferiore ai terreni contenenti la bile e i colori di anilina.

In questi ultimi anni è stato sperimentato con notevole successo un nuovo tipo di agar a base di sali di acido desoxyholico propugnato da Leifson (50). (L'acido desoxyholico è un componente della bile che non era mai stato usato in precedenza nella ricerca del gruppo Coli-aerogenes con terreni selettivi). Solo i suoi sali alcalini sono solubili nelle soluzioni aventi il pH. superiore a 7,5). In particolar modo il desoxyholato di sodio esercita su certi microbi presenti nel latte un'azione solubilizzante e ostacolante assai superiore della bile. Mentre nella zona del pH. 6,5-8,0 i microbi Gram-negativi dell'intestino crescono ancora bene, gli streptococchi e micrococchi si sviluppano malissimo o non crescono affatto. Bartram e Black (2) annoverano l'agar desoxyholato tra i terreni nutritivi che rilevano il maggior numero dei

microbi del gruppo Coli-aerogenes presenti nel latte ritenendolo migliore al brodo verde brillante, brodo lattosio fucsina, brodo taurocolato, agar hexamina e agar di Endo, mettendolo pressochè alla pari col brodo formiato ricinoleato e brodo bleu di metilene creosolporpora. Anche Yale (87) afferma essere codesto terreno nutritivo, assieme all'agar rosso violento bile, il migliore tra i dieci più comunemente usati nella ricerca del gruppo Coli-aerogenes nel latte pastorizzato.

3. - *Terreni nutritivi a base di sostanze coloranti e bile.*

Si basano sull'azione ostacolante che esercitano alcuni coloranti, in particolar modo quelli a base di anilina, sullo sviluppo dei microbi del latte non appartenenti al gruppo Coli-aerogenes, microbi che potrebbero dar luogo a risultati positivi falsi (produzione di acidità e gas) o comunque ostacolare la crescita dei ceppi del suddetto gruppo. L'azione ottenuta in detto modo però non è assoluta come è stato dimostrato da numerose ricerche eseguite in merito. Mentre da una parte non si può impedire del tutto e sempre lo sviluppo dei microbi capaci di produrre acidità e gas, non appartenenti al Coli-aerogenes (cioè risultati positivi falsi), d'altra parte i coloranti impediscono lo sviluppo di qualche ceppo del gruppo Coli-aerogenes. Per mitigare codesta azione tossica sul gruppo Coli-aerogenes è stata aggiunta a molti terreni e con notevole successo, la bile (73, 16).

Dalle numerose ricerche eseguite in merito all'efficacia di questi metodi chiamati in America « presumptive test » sono emersi i suddetti difetti, ma in modo assai vario. Maggiormente sperimentato è stato il brodo bile verde brillante proposto come metodo standard negli Stati Uniti d'America, ivi assai diffuso e generalmente ritenuto come uno dei migliori se pure non perfetto. Il gruppo Coli-aerogenes verrebbe rilevato dalla presenza di gas nei tubi di fermentazione in quantità non inferiore al 10 % del tubetto capovolto; quantità inferiori di gas darebbero risultati dubbi.

Secondo Mc Crady e Archambault (54) le reazioni positive sarebbero molto attendibili, inquantochè hanno constatato che i risultati positivi presentano, per il latte pastorizzato l'89 % e per il latte crudo, il 99 % di probabilità (qualora il gas superi il 10% del tubo capovolto), mentre i risultati dubbi (gas meno del 10 %) solamente 45 % per il latte pastorizzato e 92 % per il latte crudo. Risultati meno soddisfacenti ha ottenuto Farrell (18) per il latte crudo secondo il quale soltanto l'80 % di prove positive (gas) conterrebbe realmente i microbi del gruppo Coli-aerogenes, mentre nelle rimanenti 20% il gas viene prodotto da altri microrganismi. Farrell inoltre osserva che questo metodo non può rispondere così bene per il latte come per l'acqua, in particolar modo quando vengono seminate notevoli quantità di latte (1 cc.) inquantochè i protidi, glucidi e lipidi assorbono in parte le sostanze ostacolanti i microbi non appartenenti al gruppo Coli-aerogenes, diminuendo così il potere selettivo dei terreni. Contrariamente Yale (88) e Guitonneau, Macquot e Eyrard (20) affermano di aver ottenuto ottimi risultati seminando nel brodo bile verde brillante 1 cc. di latte pastorizzato. Parlando poi in genere dei terreni selettivi, Farrell (18) afferma che da migliaia di prove è emerso non essere sempre migliori quelle che danno il mag-

gior numero di Coli-aerogenes, perchè in molti casi permettono lo sviluppo di altri germi produttori di gas e acidità. L'A. poi conclude che non esiste un terreno selettivo con il quale si possano ottenere risultati sicuri e si domanda se vale la pena di fare l'esame di conferma nel caso brodo verde brillante (che considera tra i migliori), ove l'80 % di prove positive risultino realmente tali. Secondo Leahy (44) il 90% di prove positive ottenute col brodo verde brillante conterrebbe realmente il Coli-aerogenes. Anche Stark e Curtis (73) affermano che l'aggiunta di 1 cc. di latte abbassa il potere selettivo del brodo bile verde brillante e di altri terreni selettivi che si basano sul medesimo principio. Il gas può essere perciò prodotto da alcuni micrococchi e da qualche ceppo appartenente al Bac. proteus e, secondo Gunsalus e Stark (22, 23), anche dagli anaerobi. Stark e Curtis (72) affermano in un altro lavoro che oltre che nel brodo bile verde brillante (che è considerato uno dei migliori terreni nutritivi a base di colori di anilina) anche negli altri terreni nutritivi e precisamente nel brodo cristalvioletto di Salle, brodo di Dominik e Lauter e brodo violetto di genziana si possono sviluppare microrganismi capaci di dare risultati positivi falsi; lo stesso viene confermato da Bartram e Black (2) pur ritenendo il brodo bile verde brillante meno adatto dell'agar bile rosso violetto e l'agar bile rosso neutro per la ricerca del Coli-aerogenes, tanto nel latte crudo, quanto in quello pastorizzato. Secondo Miller e Prickett (56) l'agar bile rosso violetto non sarebbe affatto inferiore al brodo bile verde brillante.

Anche Gehm e Heukelekian (21) trovano che lo striscio sull'agar eosina bleu di metilene dà un numero di coli-aerogenes superiore all'innesto nel brodo bile verde brillante il che è secondo Demeter, assai probabilmente dovuto alla minore selettività del primo terreno.

Sempre per ciò che riguarda il potere ostacolante dei colori di anilina su alcuni ceppi del gruppo Coli-aerogenes, Shunk (75) e Horwod e Heifetz (26) scrivono che questo potere ostacolante è più basso nel brodo bile verde brillante; anche Luther e Klingen (45), seminando diverse culture del Bac. coli e Bact. aerogenes nonchè alcuni ceppi intermedi, hanno trovato che i seguenti terreni nutritivi presentano, per ordine di elenco, sempre minore sensibilità: brodo lattosato standard, brodo lattosato tamponato, brodo bleu di metilene creosolporpora, brodo bile verde brillante, brodo cristalvioletto e brodo formiato ricinoleato.

Un altro terreno selettivo assai diffuso è il brodo bile lattosio violetto di genziana di Kessler e Swenarton (39). Detti A.A. affermano che in una serie di esperienze da loro condotte, su 1010 risultati positivi solo 10 non contenevano i microbi del gruppo Coli-aerogenes. Anche Renco (67) in una serie di ricerche comparative eseguite su 57 campioni di latte crudo non ha mai trovato tubi con reazione positiva mancanti del gruppo Coli-aerogenes. Lo stesso A., dopo aver adottato il suddetto metodo nel controllo del latte da consumarsi crudo, non ha riscontrato che solamente in un paio di casi risultati positivi falsi e perciò lo ritiene assai adatto allo scopo menzionato (68). Anche Demeter, pur avendo trovato che il detto brodo dà talvolta numero di Coli-aerogenes inferiore agli altri terreni nutritivi (12) lo raccomanda per la praticità di uso e per la forte azione ostacolante che eser-

cita su alcuni streptococchi e bastoncini lattici, nonchè sui lieviti (16) e lo adotta in una serie di ricerche sul latte crudo (15). Inoltre Marschall (53) afferma di aver ottenuti risultati anche migliori dello stesso Demeter, e infine Kraievkaja (34) ne consiglia vivamente l'uso.

Per ciò che riguarda l'azione ostacolante del brodo bile violetto di genziana, il Klang (40) riferisce che le culture di *Bac. fluorescens*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Str. lactis*, *Tmb. lactis*, *Tmb. bulgaricum*, *Tmb. helveticum* e lieviti del lattosio aggiunti al brodo bile violetto di genziana assieme al Coli-aerogenes, non ostacolano affatto la crescita di quest'ultimo. In più, solamente il *Bac. fluorescens* è capace di svilupparsi senza però danneggiare il Coli-aerogenes, mentre gli altri subiscono una forte diminuzione o spariscono del tutto. Si intende che anche questo terreno nutritivo come gli altri a base di colori di anilina, esercita una certa azione ostacolante sul Coli-aerigenes (73) e secondo Minkewich (55) lascia sviluppare più il *Bac. coli* che non il *Bact. aerogenes*. Dall'altra parte Stark e Curtis (72) affermano che codesto terreno, come pure gli altri a base di colori di anilina, risulta inferiore al brodo formiato ricinoleato, per il fatto che il gas può essere prodotto da alcuni micrococchi e da qualche ceppo del gruppo *Proteus* e per il solito abbassamento del potere selettivo dovuto all'innesto di 1 cc. di latte.

Zavagli (90) ritiene invece assai adatto il brodo lattosio bile fucsina bleu di bromotimolo per il quale i risultati positivi sono dati dallo sviluppo di gas e dalla acidificazione. L'A. però giustamente afferma che i tubi contenenti il gas ed aventi reazione acida non contengono senz'altro Coli-aerogenes, ma dato che ciò si verifica nella maggioranza dei casi, dette provette possono considerarsi senz'altro positive, se all'esame microscopico presentano bastoncini Gram-negativi. Ciò è stato confermato da Renco (67) e da Holz (27); secondo quest'ultimo, detto terreno sarebbe anche superiore al brodo violetto di genziana.

Degli altri terreni a base di colori di anilina ha avuto una notevole diffusione l'agar di Endo, oggi caduto in disuso per la ricerca del Coli-aerogenes del latte, perchè troppo poco selettivo per tale scopo e dà perciò risultati molto incerti e suscettibili di grandi oscillazioni (Bartram e Black (2), Marschall (53), Demeter, Sauer e Miller (12), Mc Crady e Archambault (54). Mc Crady e Archambault affermano inoltre che sull'agar di Endo ed agar eosina bleu di metilene soltanto in media 33 % delle colonie tipiche risultano originate dai microbi del gruppo Coli-aerogenes. Quest'ultimo terreno viene sconsigliato anche da Demeter e collab. (12) poichè non possiede azione selettiva anche perchè risulta difficile la lettura delle colonie in campo azzurro.

Numeri bassi di Coli-aerogenes si ottengono invece col brodo di cristallvioioletto di Salle (79) per l'azione microbica del colorante su parecchi ceppi appartenenti al suddetto gruppo (Shermann e Wing (14) e Demeter, Suer e Miller (12) Demeter e Sauer (13) hanno trovato che su 118 ceppi di Coli-aerogenes da loro isolati 17 non erano capaci di produrre gas nel brodo cristallvioioletto.

Secondo Luther e Klinger (45), detta azione verrebbe esercitata soprattutto sui ceppi del Bac. coli.

Negli ultimi anni alcuni A.A. americani raccomandano l'agar bile rosso violetto, nel quale il Bac. coli forma entro 18-24 ore piccole caratteristiche colonie di color rosso porpora circondate dalla bile precipitata. Miller e Prickett (56) affermano che detto terreno non è affatto inferiore al brodo verde brillante, Bartram e Black lo ritengono superiore al brodo bile verde brillante e Yale (87) lo trova assieme all'agar desoxyholato il migliore dei terreni agarizzati.

Klimmer, Haupt e Brochers (38) hanno pubblicato nel 1930 risultati di una serie di esperienze eseguite sull'azione ostacolante della tripaflavina sui microbi del latte non appartenenti al gruppo Coli-aerogenes. L'aggiunta di tripaflavina in ragione di 1 : 20.000 nei terreni solidi e 1 : 10.000 nei terreni liquidi ostacolerebbe lo sviluppo degli streptococchi lattici, stafilococchi, bastoncini lattici e Bac. subtilis, mentre permetterebbe lo sviluppo del Coli-aerogenes. I suddetti A.A. propongono tre terreni nutritivi: due a base di agar con varie quantità di tripaflavina e aggiunta del bleu di bromatimolo come indicatore ed uno come brodo. Tutti e tre i suddetti terreni, assieme ad altri numerosi furono oggetto di un accurato studio da parte di Demeter, Sauer e Miller (72) i quali trovarono l'agar lattosio tripaflavina broinotimolo migliore di tutti gli altri, compreso il brodo bile verde brillante e il brodo bile violetto di genziana. Pressochè alle medesime conclusioni giunge Holz (27) trovando l'agar tripaflavina bleu di bromotimolo il migliore fra i terreni nutritivi solidi, i quali rispetto a quelli liquidi, darebbero in media un numero di Coli-aerogenes superiore del 50%, mentre Marschall afferma che il brodo bile violetto di genziana dà numeri di Coli-aerogenes 2-3 volte e persino 10 volte superiori all'agar di tripaflavina. Lo striscio coll'ansa Burri sul detto terreno darebbe risultati migliori. Detto agar è stato prescritto dal Ministero dell'Agricoltura Prussiano nel metodo standard per la ricerca del Coli-aerogenes nel latte destinato alla alimentazione dei bambini (Kindermilch).

4. - *Terreni nutritivi a base di rosso neutro.*

Il brodo rosso neutro è uno dei più vecchi terreni adottati per la ricerca del Coli-aerogenes nelle acque. I microbi del gruppo Coli-aerogenes hanno la proprietà di conferire al rosso neutro la colorazione gialla e fluorescenza verde. La fluorescenza verde sarebbe dovuta alla riduzione del rosso neutro per opera di idrogeno, mentre la colorazione gialla alla messa in libertà della base del rosso neutro. Secondo Rochaix e Dufourt (69) quest'ultima reazione avverrebbe solamente in reazione alcalina, perchè la comparsa della colorazione gialla sarebbe dovuta all'azione di alcali sul rosso neutro, il fenomeno però deve essere più complesso, perchè anche nel brodo rosso neutro aggiunto di zucchero, dal quale vengono prodotti gli acidi, si osserva la caratteristica reazione. Perciò Vassileff (81) raccomanda l'uso del brodo rosso neutro senza l'aggiunta di zuccheri. Ciò nonostante lo stesso A. aggiunge al brodo rosso neutro anche 1 cc. di latte, il che apporta

lo zucchero e necessariamente, se vi è sviluppo di Coli-aerogenes, produzione di acidità. In una serie di ricerche comparative Renco (67) ha trovato il brodo rosso neutro senza zucchero nettamente inferiore al brodo bile violetto di genziana e brodo bile fucsina bleu di bromotimolo. Tra gli altri terreni a base di rosso neutro sono più comunemente usati il brodo glucosio rosso neutro di Savage e quello di Neri proposto per l'acqua. La ricerca del Coli-aerogenes eseguita con quest'ultimo terreno e completata da un esame di conferma, eseguendo la semina sull'agar per avere culture di isolamento, darebbe secondo de' Rossi (17), risultati assai soddisfacenti. S'intende che il brodo rosso neutro così preparato non è selettivo e che i fermenti lattici presenti in abbondanza nel latte crudo possano ostacolare lo sviluppo del Coli-aerogenes. Ciò può essere in parte evitato con aggiunta di bile, aggiunta che può dare, secondo Renco (67), realmente dei buoni risultati.

5.- *Terreni nutritivi a base di ricinoleati e formiati.*

Stark e England (71) hanno proposto nel 1935 un nuovo terreno nutritivo liquido a base di ricinoleato sodico e formiato sodico per la ricerca del gruppo Coli-aerogenes nelle acque e nel latte. Questo terreno nutritivo avrebbe rispetto agli altri, a base di coloranti, il vantaggio di non ostacolare affatto i germi del gruppo Coli-aerogenes, anzi il loro sviluppo verrebbe favorito. Nello stesso tempo impedirebbe totalmente la crescita di altri microbi presenti nell'acqua o nel latte capaci di produrre gas e dare così luogo a risultati falsamente positivi; quest'ultima azione sarebbe dovuta particolarmente al ricinoleato sodico, mentre il formiato sodico, pur avendo un'azione pressochè uguale, favorirebbe lo sviluppo del Coli-aerogenes (ciò anche per la sua azione di tampone). Un altro vantaggio sarebbe rappresentato dallo sviluppo di Salmonelle capaci di produrre gas dall'acido formico, inquantochè detta fermentazione porta un accumulo di Na OH ed Na HCO₃ con un aumento del pH che dopo due giorni dalla semina risulta sempre superiore al 6,0. Questi vantaggi del brodo ricinoleato formiato rispetto ai terreni a base di coloranti vengono confermati in un altro lavoro di Stark e Curtis (72). Dalle esperienze di Gunsalus e Stark (23, 24) risulta che detti vantaggi si farebbero sentire soprattutto nella ricerca del Coli-aerogenes nel latte crudo, mentre per il latte pastorizzato si otterrebbero, con il brodo verde brillante, pressochè i medesimi risultati. Gli stessi A.A. affermano che dal controllo di 147 prove positive, 144 risultavano contenenti realmente Coli-aerogenes e, in un'altra serie di esperienze eseguite su 665 campionidi latte pastorizzato con reazione positiva, solo 2% di casi positivi non contenevano microbi del gruppo Coli-aerogenes.

Secondo Yale (88) si possono ottenere ottimi risultati nella ricerca del Coli-aerogenes in 1 cc. di latte pastorizzato tanto con il brodo ricinoleato e formiato quanto con il brodo verde brillante. Bartram e Black (2) dopo aver fatto ricerche comparative con numerosi terreni nutritivi trova come migliori il brodo bleu di metilene creosolporpora, brodo formiato ricinoleato, agar desoxyholato, seppure con nessuno di questi si possa impedire completamente lo sviluppo dei microbi non appartenenti al Coli-aerogenes.

Gli stessi A.A. propongono un altro terreno agarizzato a base di ricinoleato e formiato con aggiunta di rosso neutro e bleu di metilene. Luther e Klinger (45), provando lo sviluppo di diverse culture di Bac. coli, Bact. aerogenes e di alcuni ceppi intermedi, trovano che il brodo ricinoleato formiato presenta minor sensibilità del brodo lattosato (standard), brodo lattosato tamponato, brodo fucsina, brodo bleu di metilene creosolporpora, brodo bile verde brillante e brodo crisalvioletto. Verso il cristalvioletto e formiato ricinoleato si dimostrerebbero particolarmente sensibili i ceppi del Bac. coli, un po' meno quelli del Bact. aerogenes e forme intermedie. Pure Leahy (44) trova il brodo formiato ricinoleato pressochè ugualmente sensibile al brodo bile brillante, inquantochè con metodi standard ha trovato nel primo 88% di casi Coli-aerogenes, mentre nel secondo 90%.

6. - *Prova dell'indolo.*

In alcuni laboratori francesi (20) ed anche in qualche altro paese d'Europa (49) viene usata anche oggi la prova dell'indolo per la ricerca del Bac. coli nel latte. Tale prova viene eseguita nel brodo peptonato fenico, nell'acqua peptonata o nel brodo tripsina dopo 1-4 giorni di incubazione a 37°C con aggiunta di ben noti reagenti. Il metodo è da scartarsi qualora si debba ricercare il Bac. coli in 1 cc. o in 0,1 cc. di latte, inquantochè la presenza del lattosio impedisce lo sviluppo dell'indolo (Oeser (64) Lerner (49)). La prova dell'indolo dovrebbe servire dunque per la ricerca del solo Bac. coli, pur essendo noto che non mancano ceppi del Bact. aerogenes capaci di produrre indolo (64) e che ne esistono alcuni altri appartenenti al Bac. coli incapaci di detta attività. I fattori sopra indicati rendono perciò la prova dell'indolo poco adatta per la ricerca del Coli-aerogenes del latte. Ciò venne dimostrato particolarmente dagli studi comparativi eseguiti da Demeter, Sauer e Miller (12) e da Guittonneau, Macquot e Eyrard (20), i quali la trovano nettamente inferiore ai terreni a base di coloranti (in particolar modo verde brillante e violetto di genziana).

METODI PRATICI DI DIFFERENZIAZIONE DEL BACT. COLI E DEL BACT. AEROGENES.

Provenienza e significato del Bac. coli e Bact. aerogenes nel latte

Come è stato osservato precedentemente, la ricerca del gruppo Coli-aerogenes nel latte ha importanza dal punto di vista igienico solamente in quanto questa serve a rilevare la presenza di ceppi di origine fecale e precisamente del Bac. coli. Perchè è stato constatato che le feci umane e bovine contengono quasi esclusivamente il Bac. coli, mentre il Bact. aerogenes predomina invece, oltre che nel terreno, anche sui tuberi, cereali, nella polvere ed anche nelle acque che non hanno subito un recente inquinamento fecale (Mc Conckey (59), Clemesha (10), Johnson (31), Levine (47, 48), Koser (36, 37), Kon (33), Malcolm (57), Wilson (86)). Infatti Mc Conckey (59) ha riscontrato su 241 ceppi del gruppo Coli-aerogenes, isolati dalle feci, solo 4 appartenenti al Bact. aerogenes e Malcolm (57), dall'analisi

di 114 campioni di feci provenienti da vacche tenute in stalla durante l'inverno e al pascolo durante l'estate, ha isolato 342 ceppi di Coli-aerogenes, dei quali 96,4% erano rappresentati dal tipico Coli e 3,6% dal Bact. aerogenes, Bac. cloacae ed altri simili. Secondo Kon (33) le feci e la lettiera contengono esclusivamente Bact. coli, e l'origine del Bact. aerogenes nel latte è da ricercarsi nell'inquinamento dovuto ai recipienti.

Tutto ciò non vuol dire che tutti i ceppi appartenenti al Bac. coli presenti nel latte provengono direttamente dalle feci. Come hanno dimostrato Guittonneau, Macquot e Eyrard (20) e come ha potuto constatare lo scrivente, il Bac. coli si moltiplica benissimo nei recipienti, imbottigliatrici, refrigeranti poco puliti e perciò assai spesso il suo alto contenuto nel latte non è da ascrivere al diretto inquinamento fecale. Inoltre è noto che, dal punto di vista igienico, il maggior pericolo è rappresentato dall'inquinamento del Bac. coli di origine fecale umana, il che si verifica rarissimamente, mentre le feci bovine si trovano nella stalla un po' dappertutto.

D'altra parte non bisogna dimenticare che anche la presenza del Bact. aerogenes è dovuta alla scarsa pulizia nella produzione, inquantochè è stato dimostrato che detto germe non si trova quasi mai nel latte contenuto nella mammella (Renco (168)).

Tenendo presenti le suindicate fonti di inquinamento si comprende facilmente come, col variare delle condizioni di produzione, può variare il numero del Coli-aerogenes ed il rapporto tra il Bac. coli e Bact. aerogenes nel latte.

Infatti ciò è stato confermato dalle ricerche condotte in merito da vari A.A., ricerche che purtroppo non possono essere paragonabili che con una certa approssimazione, perchè nella classificazione dei ceppi non tutti gli A.A. hanno seguito il medesimo criterio. Si crede utile di riportare i risultati di alcuni lavori eseguiti in merito.

Yale (89), applicando le classificazioni di Bergey a 91 ceppi isolati nel latte crudo trova 63 % appartenenti al Bac. coli, 26 % al Bact. aerogenes e 11 % a forme intermedie, considerando come forme intermedie i ceppi che danno reazione del rosso metile e del citrato positiva e quella di Voges-Proskauer negativa.

Oeser (64) riferisce che 164 ceppi isolati dal latte crudo, seguendo sempre la classificazione di Bergey, 107 appartenevano al sottogruppo del Bac. coli e 57 al Bact. aerogenes, adottando invece le reazioni dell'indolo, rosso metile, Voges-Proskauer e citrato si dovettero ascrivere 56 al tipico Bac. coli e 8 al tipico Bact. aerogenes, mentre la rimanenza alle forme intermedie.

Bartram e Black (4), in una serie di ricerche eseguite su 331 campioni di latte dal quale isolarono 310 culture di Coli-aerogenes, trovano 57 % ceppi appartenenti al Bac. coli (con predominio di Bat. coli comunior con 12 ceppi) 22 % al Bact. aerogenes e 21% alle forme intermedie.

Farrel (18) ha trovato invece su 140 culture, isolate dal latte, con l'agar eosina bleu di metilene 53% di ceppi appartenenti al Bac. coli, 40% al Bact. aerogenes e 7% alle forme intermedie.

Rogers, Clark e Davis (66) trovano pressochè il medesimo rapporto con 52% ceppi di origine fecale e 48% di origine non fecale.

Anche Zavagli (90) ha riscontrato una percentuale non molto diversa, con 46% di ceppi del Bac. coli, 44% del Bact. aerogenes e 10% di forme non esattamente classificabili.

Guittonneau e Collab (20) trovano invece una percentuale di Bac. coli alquanto più alta, con 32 ceppi di Bac. coli tipico, 8 di atipico e 14 ceppi di Bact. aerogenes tipico e di 2 atipico, su 56 culture isolate dal latte.

Le percentuali più basse di Bac. coli sono state ottenute da Demeter e Sauer (13) con 25,3 % di Bac. coli dei quali 10,1 % di coli non tipico, 19% di Bact. aerogenes (9,1% non tipico) e 55,5% di ceppi intermedi, da Phyllis Kon (65), con 29% di Bac. coli, 48% di Bact. aerogenes e 22,4% di forme intermedie e da Chalmers (8) con 19% di Bac. coli e 29,6% di Bact. aerogenes.

Anche secondo Kon (33) il Bac. coli ha nel latte assoluta predominanza sul Bact. aerogenes. Una classificazione molto precisa è stata eseguita dalla Lipska (46) su 200 ceppi del Coli-aerogenes isolati da 600 lattici. Tra questi furono classificati 13% come Bact. neapolitanum, 19,5% Bact. lactis aerogenes, 19,5% Bact. coli comune, 7% Bact. coli comunior e 13% come Bac. acidi lattici.

Tutti questi dati dimostrano che i microbi del gruppo Coli-aerogenes presenti nel latte sono rappresentati dal Bac. coli con una percentuale che oscilla all'incirca da 25-70%. Tenuto conto di queste oscillazioni, ma soprattutto dell'importanza del Bac. coli come germe di origine fecale, molti A.A. hanno cercato di introdurre metodi semplici e rapidi per differenziare il Bac. coli dal Bact. aerogenes.

Tra le più importanti e più sperimentate sono indubbiamente le prove dell'indolo, rosso metile, Voges-Proskauer e del citrato. Ma oltre a queste, lasciando da parte le prove di fermentazione degli zuccheri, ne sono state proposte numerose altre tenute generalmente meno in considerazione delle precedenti. Tra queste si deve ricordare in primo luogo la prova di Eijkmann che consiste nell'incubazione delle culture in brodo peptone alla temperatura di 46 ° C., alla quale si svilupperebbero solamente i ceppi del Bac. coli provenienti dagli animali a sangue freddo. I risultati sarebbero soddisfacenti (Zavagli (90)).

Un altro metodo differenziale proposto da Koser (41) si basa sulla capacità del Bact. aerogenes di utilizzare l'azoto dall'acido urico, capacità che manca al Bac. coli.

I metodi più recenti si basano sulle seguenti caratteristiche:

1) La fissazione dello iodio. Secondo Barthel (5, 7) il Bac. coli non è in grado di produrre nel latte le sostanze fissanti lo iodio, mentre il Bact. aerogenes ne produce in notevole quantità.

2) Comportamento verso l'acido borico, Vaughn e Levine (83) riportano la composizione di un terreno nutritivo a base di acido borico, terreno nel quale soltanto il Bac. coli sarebbe capace di produrre gas. Detti A.A. riferiscono che su 148 ceppi di Bac. coli 95,3% produssero gas dopo 48 ore a 43-44° C., mentre ciò non avvenne nè per i 181 ceppi del Bact. aerogenes, nè per le 53 forme intermedie (Citrobacter). Risultati pressochè identici riportano Bartram e Black (3) usando la temperatura di 37° C. invece di 43° C.

3) Comportamento verso l'acido tellurico. Secondo Chahners (8) una soluzione di acido tellurico allo 0,0013% in terreni contenenti sali biliari e lattosio impedisce lo sviluppo del *Bact. aerogenes*, mentre non disturba il *Bac. coli*, viceversa avviene nei terreni contenenti verde brillante in ragione dello 0,0006%. Seminando il latte in ambedue i terreni si può vedere con una certa sicurezza quale dei due microbi ha il predominio.

4) Comportamento verso il citrato di sodio nel terreno di Littmann e Stark (43). Si tratta di agar a base di citrato e ricinoleato sodico, al quale si aggiungono il rosso neutro e bleu di bromotimolo come indicatori. Al terreno bisogna aggiungere 1 cc. di latte per portare il lattosio e per permettere di rilevare la proteolisi. Il *Bact. aerogenes* forma colonie circondate di colore azzurro (perchè attaccando il citrato dà reazione alcalina), mentre quelle del *Bac. coli* sono rosse. I proteolitici si distinguono da una zona trasparente attorno alle colonie.

Nessuno dei suddetti metodi dà risultati del tutto sicuri, perciò alcuni A.A. hanno cercato di combinare diverse prove per ottenere così una diagnosi più precisa.

La combinazione più comunemente scelta si basa sulle prove dell'indolo, rosso di metile, Voges-Proskauer e del citrato.

Prova, dell'indolo, rosso di metile, Voges-Proskauer e citrato.

Prova dell'indolo. - Pur avendo riscontrato alcuni A.A. ceppi del *Bac. coli* incapaci di produrre indolo e quelli del *Bact. aerogenes* capaci di produrlo, la sua ricerca, per la distinzione dei due ceppi, se abbinata con altre prove, offre degli indizi assai soddisfacenti (64). Ruchhoft, Kallas, Chimm e Coulter (70) ritengono la prova dell'indolo come un ottimo mezzo diagnostico ed assai stabile ed anche Demeter e Sauer (13) le attribuiscono una notevole importanza. Come è già stato osservato la prova deve essere eseguita sulle culture ottenute nei terreni privi di zuccheri, perchè questo ostacola la produzione di indolo.

Prova del rosso di metile. - Secondo Clark e Lubs (9) i ceppi appartenenti al *Bac. coli* produrrebbero più acidità che non quelli appartenenti al *Bact. aerogenes*; aggiungendo perciò a una cultura in brodo glucosato il rosso di metile si ha una colorazione rossa per il *Bac. coli* e gialla per il *Bact. aerogenes*.

Secondo Ruchhoft e Collab. (70) la prova del rosso di metile dà, in combinazione colle altre, dei buoni risultati, mentre Demeter e Sauer (13) con Oeser (64) non la ritengono molto esatta e molto stabile. Singer (77) inoltre afferma l'esistenza di alcuni ceppi del *Bac. coli* deboli acidificatori e di altri del *Bact. aerogenes* forti produttori di acidità. Syrocki e Collab (76) invece consigliano di sostituire il rosso neutro con la limatura di ferro che verrebbe attaccata solamente dalla forte acidità prodotta dal *Bac. coli* (pH inferiore a 4,98). L'attacco del ferro può essere messo in evidenza con aggiunta di ferrocianuro di potassio.

Reazione di Voges-Proskauer. - La reazione di Voges-Proskauer consiste essenzialmente nell'allestire le culture in brodo glucosato nel quale siri-

cerca l'acetilmetilcarbinolo con aggiunta di idrato sodico o potassico. L'acetilmetilcarbinolo verrebbe prodotto solamente dal Bact. aerogenes. Il chimismo della reazione non sembra molto semplice e, secondo Harden (30), consiste in un primo tempo nella produzione da parte del gruppo Coli-aerogenes; di 2,3 di butilenglicolo, il quale verrebbe ulteriormente ossidato solamente dal Bact. aerogenes e così trasformato in acetilmetilcarbinolo. Il Bac. coli invece non è in grado di produrre l'acetilmetilcarbonilo.

La prova di Voges-Proskauer è stata oggetto di numerosi studi; particolarmente importanti sono i lavori di Clemesha (10) Harden e collab. (28, 29), Mc. Conckey (62), Levine (47, 48), Johnson e Levine (32), Koser (36), Ruchhof e Collab. (70) e altri, lavori dai quali risulta che i ceppi del gruppo Coli-aerogenes provenienti dalle feci umane e animali danno rarisimamente la reazione Voges-Proskauer positiva.

Per l'esecuzione della prova sono stati proposti vari procedimenti tra i quali il più sensibile e preciso sarebbe secondo Gorrieri (19), e Demeter e Sauer (13), quello di Leifson (42), ma anche quello di Werkmann (84) darebbe buoni risultati. In ogni caso l'incubazione dei microbi del gruppo Coli aerogenes non si deve protrarre a lungo, perchè lo stesso Bact. aerogenes è capace di scomporre l'acetilmetilcarbinolo (Williams e Morow (85), Ruchhof e Collab (70)).

Prova del citrato. - Secondo Koser (37,35) il Bact. aerogenes può utilizzare come fonte di carbonio l'acido citrico sotto forma di sali di sodio, potassio ed ammonio qualora venga coltivato su un terreno sintetico appropriato, mentre i ceppi del Bac. coli di origine fecale, non posseggono tale proprietà. L'attacco dei citrati ha per conseguenza un aumento del pH che da 6,8 (reazione del terreno sterile) sale sino a 8,4-9,0. Secondo Ruchhof e collaboratori solamente il Bact. aerogenes si sviluppa realmente bene e bastano 3 giorni a 37° C. per la lettura dei risultati. Secondo i suddetti A.A. la prova ha un grande valore diagnostico ed anche Demeter e Sauer (13) la trovano soddisfacente e costante.

*Il valore diagnostico delle prove dell'indolo, rosso di metile,
Voges-Proskauer e del citrato.*

Dato che nella ricerca dei microbi del gruppo Coli-aerogenes nel latte interessa più la loro origine fecale o non fecale che la identificazione delle singole specie, le quattro suddette prove, eseguite contemporaneamente, assumerebbero indiscutibilmente un valore diagnostico di grande importanza. Se le singole prove dessero risultati sempre esatti tutti i ceppi dovrebbero presentare solamente due tipi di combinazioni e precisamente: i ceppi di origine fecale le prove di indolo e di rosso di metile positive e le prove di Voges-Proskauer e dei citrati negative, il che si usa indicare brevemente + + - -, mentre i ceppi di origine non fecale le prime 2 negative e le seconde positive cioè - - + +.

Il che per diverse ragioni non si verifica sempre, perchè come dimostrano i vari lavori, si ottengono, oltre alle suddette, diverse altre combinazioni. La ragione principale sta nel fatto che nessuna delle suindicate prove dà risultati

assolutamente sicuri e purtroppo sin'ora non è stata accertata l'origine di tutti i ceppi che danno luogo a queste nuove combinazioni. Non si può escludere d'altra parte, nella ricerca pratica che alcune di dette combinazioni (teoricamente ne potrebbero esistere 16 e Demeter e Sauer (13) ne hanno riscontrate 13) siano dovute alle culture miste (Ruchhoft e Collab (70)), perchè dette prove vengono, per ovvie ragioni di praticità, generalmente allestite con culture di arricchimento provenienti direttamente dal latte.

I lavori più completi eseguiti in merito sono quelli di Ruchhoft e Collab (70), Demeter e Sauer (13) e Oeser (64). Prendendo in esame alcune delle suddette combinazioni si trova che Demeter e Sauer considerano le combinazioni $+ - + +$, $+ + - +$ dovute al Bac. coli atipico e quelle $- - + -$, $- - - +$ al Bact. aerogenes atipico. Secondo Ruchhoft e collab. sono da considerarsi le combinazioni $+ - - -$, $+ + + -$, $+ - + -$, $- + + -$ come culture miste; quest'ultima ($- + + -$) secondo Demeter e Sauer risulterebbe appartenere - con le prove di fermentazione della dulcite e del saccarosio - al Bact. aerogenes. Ceppi con combinazione $- + - +$ sono stati riscontrati nel terreno e nell'acqua e solo raramente nelle feci. Ceppi che danno le combinazioni $- - + -$, $- - - -$, non appartengono, secondo Ruchhoft, al gruppo Coli aerogenes, mentre la combinazione $+ + + +$ è da considerarsi, secondo Demeter e Sauer, in base alle altre prove, assai vicina al Bact aerogenes.

Senza continuare con l'esame di altri casi si rende evidente che nemmeno le combinazioni di dette prove possono indicare in molti casi con precisione l'origine dei singoli ceppi del gruppo Coli-aerogenes.

CONCLUSIONI

Dalla rassegna delle principali ricerche riguardanti i metodi di ricerca del gruppo Coli-aerogenes nel latte si crede di poter trarre le seguenti deduzioni.

1. I microbi del gruppo Coli-aerogenes sono sempre presenti nel latte crudo del mercato, ma la loro importanza, dal punto di vista igienico, dipende in parte dalla origine ed in parte dalla quantità dei ceppi. Dal punto di vista tecnologico delle trasformazioni del latte è importante invece soltanto il numero complessivo dei germi del suddetto gruppo.

2. Per la ricerca quantitativa e qualitativa (distinzione tra i ceppi di origine fecale e non fecale) sono stati proposti numerosi metodi dei quali alcuni, molto usati, sono stati oggetto di numerose ricerche.

3. I metodi della ricerca del gruppo Coli-aerogenes consistono sostanzialmente nella semina di quantità decrescenti del latte sui terreni elettivi o di arricchimento. Con nessuno di questi, compresi i migliori, si ottengono risultati del tutto sicuri.

Tra i migliori metodi e più comunemente usati sono alcuni appartenenti a quelli che si basano sulla produzione di acidità e di gas (o solo gas) nei ter -

reni nutritivi contenenti la bile o sali biliari e colori di anilina, e precisamente: brodo lattosio bile verde brillante, brodo lattosio bile violetto di genziana e brodo lattosio bile fucsina bleu di bromotimolo.

Secono alcuni A.A. americani si ottengono risultati anche superiori con terreni a base di formiato e ricinoleato sadico e, secondo tedeschi, coll'agar a base di tripaflavina.

In nessuno di detti terreni però si riesce, da una parte, sicuramente a impedire lo sviluppo dei microbi capaci di dare risultati positivi falsi, e dall'altra a non ostacolare qualche ceppo del gruppo Coli-aerogenes. Dato che la percentuale degli scarti è relativamente piccola non conviene in pratica fare gli esami di conferma.

4. Per la distinzione tra ceppi di origine fecale (Bac. coli) e quelli di origine non fecale (Bact. aerogenes), fra i numerosi metodi proposti è assai usata la combinazione delle prove dell'indolo, rosso di metile, Voges-Proskauer e citrato. Anche con queste prove non si può mettere sempre con sicurezza in evidenza l'origine dei ceppi. Si domanda perciò se vale la pena di applicarle all'analisi pratica del latte, inquantochè i ceppi di origine fecale provengono generalmente dalle feci bovine e dai recipienti poco puliti, nei quali si sono abbondantemente moltiplicati.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Abraham G.* - Untersuchungen über eine durch ein atypisches Coli-bakterium hervorgerufene Milchinfektion. «Zentralbl. f. Bakter.», Abt. I, 1929, 113, 74.

(2) *Bartram M. T. and Black L. A.* - Detection and significance of the coliform group in milk. I. A comparison of media for use in isolation. «Food Research », 1936, 1, 551.

(3) *Bartram M. T. and Black L. A.* - Reaction of Escherichia, Aerobacter and Citrobacter strains in boric acid and hexamine media. « Journ. Bact. », 1936, 31, 24.

(4) *Bartram M. T. and Black L. A.* - Detection and significance of the Coliform group in milk. II. Identification of species isolated. «Food Research », 1937, 2, 21.

(5) *Barthel Cr.* - Nouvelle methode pour differencier au point de vue biochimique les groupes de bacteries Coli et Aerogenes. « Annales de l'Ecole Supérieure d'Agriculture de Suède », 1936, 3, 179.

(6) *Bergey D. H.* - «Determinative Bacteriology ». London, 1930.

(7) *Barthel Cr.* - Une nouvelle methode de differenciacion biochimique des groupes coli et aerogenes. « Le Lait », 1932, 12, 610.

(8) *Chalmers C. H.* - The significance of true *B. coli* (*B. coli comunis*) and *B. lactis aerogenes* in samples of milk. «Zentralbl. f. Bakter.», II, 1934, 89, 459.

(9) *Clark W. M. and Lubs H. A.* - The differentiation of Bacteria of the colon aerogenes family by the use of indicators. «Journ. Inf. Dis.», 1915, 17, 160.

(10) *Clemesha E. E. C.* - The bacteriology of inland waters in the tropics. Calcutta, London 1912. Citato da Levine: «Journ. Bact.», 1916, 1, 153.

(11) *Chalmers C. H.* - «Journ. Hyg.», 1928, 27, 295.

(12) *Demeter K. I., Sauer F., Miller M.* - Vergleichende Untersuchungen über verschiedenen Methoden zur Coli-aerogenes Tiberbestimmung in Milch. «Milchw. Forsch.», 1933, 15, 265.

(13) *Demeter K. I. and Sauer F.* - Beiträge zur Kenntnis der Coli-aerogenes - Bakterium in Milch. «Milchw. Forsch.», 1934, 16, 236.

(14) *Dominik I. R. and Lauter C. J.* - Methylene bleu and brom. creosol purple in differentiating bacteria of the colon aerogenes group. «Journ. Amer. W. W. Ass.», 1929, 21, 1067.

(15) *Demeter K. J. und Ordolff H.* - Beiträge zur mikrobiologischen Bestimmung der Käseeritauglichkeit von Milch. «Milchw. Forsch.», 1931, 12, 1.

(16) *Demeter K. J.* - «Bakteriologische Untersuchungsmethoden». Urban-Schwarzenberg, Berlin 1934, p. 32.

(17) *De Rossi G.* - «Microbiologia Agraria e Tecnica», U.T.E.T., Torino, 1928.

(18) *Farrel M. A.* - A comparison of ten presumptive test media used in the detection of the Escherichia - aerobacter group in milk. «Journ. Dairy Sci», 1937, 20, 67.

(19) *Gorrieri A.* - A propos de quelques perfectionnements dans la technique de l'épreuve de Voges - Proskauer pour l'étude du groupe coli-aerogenes. «Società Intenazionale di Microbiologia - Bollettino della Sezione italiana», 1932, 4, 199.

(20) *Guillonnet G., Macquot G., Eyrard E.* - Recherches sur la pasteurisation des laits de consommation. Sur la colimétrie appliquée aux contrôles de la pasteurisation des laits et des lait pasteurisés. «Le Lait», 1939, 19, 113.

(21) *Gehm H. W. and Heukelekian H.* - Eosin methylene bleu smear agar for rapid direct count of *E. Coli*. «Journ. Bact.», 1935, 29, 28.

(22) *Gunsalus J. C. and Stark C. N.* - An evaluation of formate-ricinoleate broth for the detection of colon-organisms in raw and pasteurized milk. «Journ. Bact.», 1937, 34.

- (23) *Gunsalus J. C. and Stark C. N.* - Formate ricinoleate and brilliant green bile broths to detect coliform organisms in pasteurized milk. «Amer. Journ. Publ. Health », 1938, 28, 832.
- (24) *Gaffky.* - Erkrankungen an infektiöser Enteritis infolge des Genusses ungekochter Milch. «Deutsch. Med. Wocheschr ». 1892, 18, 297.
- (25) *Gabbano L.* - Il significato ed il valore dell'esame batteriologico del latte. «L'Igiene Moderna », Genova, 1931.
- (26) *Horwod M. P. and Heifetz A.* - A comparative study of certain media used in presumptive test for Bact. Coli. « Journ. Bacter. », 1934, 28, 199.
- (27) *Holz H.* - Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis des Coligehaltes der Milch. Ref. «Milchw. Forsch », 1938, 19.
- (28) *Harden A.* - The chemical action on glucose of the lactose - fermenting organisms of faeces. « Journ. of Hyg », 1905, 5, 488.
- (29) *Harden A.* - On Voges and Proskauers reaction for certain Bacteria. «Proceed. Roy. Soc. London. Ser. B », 1906, 77, 424.
- (30) *Harden A. and Walpole G. St.* - Chemical action of Bacillus lactis aerogenes on glucose and mannitol: Production of 2 : 3 Butylenglycol and acethylmethylcarbinol. « Proceed. Roy. Soc. London Ser. B. », 1906, 77, 399.
- (31) *Johnson B. R.* - Coli-like organisms of the soil. «Journ. Bact. », 1916, 1, 96.
- (32) *Johnson B. R. and Levine M.* - Characteristics of coli-like microorganisms from the soil. «Journ. Bact. », 1917, 2, 379.
- (33) *Kon P. M.* - Organisms a forme Coli dans le lait e dans le matières fécales des bovines. «Journ. of Dairy Research. », 1933, 4, 206.
- (34) *Kraievskaja A. B.* - Méthode de détermination dans le lait de Bact. coli dans les entreprises industrielles de lait. « Microbiologie », 1935, 4, 73. - Rec. «Le Lait », 1937.
- (35) *Koser St. A.* - Correlation of citrate utilization by members of the colon aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. « Journ. Bact », 1924, 9, 59.
- (36) *Koser St. A.* - Differential test for colon - aerogenes group in relation to sanitary quality of water. «Journ. Inf. Dis. », 1924, 35, 315.
- (38) *Klimmer M., Haupt H., Brochers F.* - Ueber das Vorkommen und die Bestimmung der Coli - und di Aerogenes Bakterien in der Milch. «Milchw. Forsch », 1930, 9, 236.
- (39) *Kessler M., Swenartoz I. C.* - Gentian violet lactose peptone bile for the detection of B. coli in milk. «Journ. Bact. », 1927, 14, 47.
- (40) *Klang I.* - Nachweis des Bacterium Coli in Milch durch Gasbildung in Gentianaviolettgallepeptonmilchzuckerlösung. «Milchw. Forsch. », 1931, 12, 494.

- (41) *Koser St. A.* - The employment of uric acid synthetic medium for the differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes*. « Journ. Inf. Dis », 1918, 23, 377.
- (42) *Leifson E.* - An improved reagent for the acetyl - methyl - carbinol test. « Journ. Bact. », 1932, 23, 353.
- (43) *Littmann M. L. and Stark C.N.* - Citrate-ricinoleate agar for the detection of *Escherichia*, *Aerobacter* and proteolytic gramnegative rods in milk. « Journ. Bact. », 1937, 34, 348.
- (44) *Leahy H. W.* - A comparison of brilliant green lactose bile and formate ricinoleate media for the detection of the *Escherichia* - *Aerobacter* group in milk and ice cream. « Journ. Bacter. », 1937, 34, 438.
- (45) *Luther A. B. and Klinger M. E.* - A comparison of media for the detection of *Escherichia* *Aerobacter*. « Journ. Bact. », 1936, 31, 171.
- (46) *Lipska I.* - Etudes biochimiques sur les bacilles du groupe coli-aerogenes du lait. « Le Lait », 1934, 14, 673;
- (47) *Levine M.* - On the significance of the Voges-Proskauer Reaction. « Journ. Bact. », 1916, 1, 153.
- (48) *Levine M.* - The correlation of the Voges-Proskauer and Methyl-red reaction in the Coli-aerogenes group of Bacteria. « Journ. Inf. Dis. », 1916, 18, 358.
- (49) *Lerner M.* - Une methode de titrage du « *Bacterium coli* » dans le lait, le babeurre, le fromage. « Le lait », 1935, 15, 833.
- (50) *Leifson E.* - New culture media based on sodium desoxyholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. « Journ. of Path. and Bact. », 1935, 40, 581.
- (51) *Lehmann e Neumann.* - « Bakteriologische Diagnostik », München, 1927.
- (52) *Lepanto P.* - Il contenuto del latte in coli-bacilli ad altri germi a Trapani. «L'Igiene Moderna», Genova, 1931.
- (53) *Marschall H.* - Die praktische Auswirkung der Untersuchungsmethode auf die Höhe des ermittelten Coli-Aerogenes Gehaltes von Milch und Milchprodukten. « Oesterr. Milchw. Zeit. », 1934, 41, 313.
- (54) *Mc. Crady M. H. and Archambault J.* - Examining dairy products for members of the *Escherichia* *Aerobacter* group. « Amer. Journ. Publ. Health » 1934, 24, 122.
- (55) *Minkewich. J. E.* - Zur Bestimmung der Coli-aerogenes Titters in Milch. « Zentralbl. f. Bakter. ». Abt. I, 1932, 125, 125.
- (56) *Miller N. J. and Prikett P.* - Note on violet red bile agar for detection of *Escherichia coli*. « Journ. of Dairy Sci. », 1938, 21, 559.
- (57) *Malcolm, G. F.* - The types of Coliform Bacteria in Bovine Faeces. « Journ. Dairy Res. », 1935, 6, 383.

- (58) *Matuszewski T.* und *Supinska J.* - Ueber die quantitative Auswertung der Coli Titors. «Zentralbl. f. Bakter», II, 1937, 96, 369.
- (59) *Mc. Conckey A.* - Lactose fermenting Bacteria in faeces. «Journ. Hyg.», 1905, 5, 333.
- (60) *Mc. Conckey A.* - Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations. «Journ. Hyg.», 1908, 8, 322.
- (61) *Mc. Crady.* - Tables for rapid interpretation of fermentation tube results. «Journ. Publ. Health.». Toronto, 1918, 9.
- (62) *Mc. Conckey A.* - Further observations on the differentiation of lactose fermenting bacilli with special reference to those of intestinal origin. «Journ. Hyg.», 1909, 9, 86.
- (63) *Neri F.* e *Simonetti A.* - Sulla presenza e sul significato del coli nel latte. «Annali d'Igiene», 1930.
- (64) *Oeser H.* - Bacterium Coli in der Milch. Ein Beitrag zur Erforschung der Coli-aerogenes Gruppe. «Zentralbl. f. Bakter.». II, 1937, 96, 287.
- (65) *Phyllis Kon.* - «Journ. Dairy Res.», 1933, 4, 206. Cit. da Demeter e Sauer. «Milchw. Forsch.», 1934, 16, 236.
- (66) *Rogers Clark* and *Davis.* - The colon group of Bacteria. «Journ. Inf. Dis.», 1914, 4.
- (67) *Renco P.* - Ricerca quantitativa del gruppo coli-aerogenes nel latte. «Annali dell'Istituto Sperimentale di Caseificio di Lodi», 1937, 7.
- (68) *Renco P.* - «Microbiologia del latte e dei latticini». U. Hoepli, Milano, 1939, p. 703 e 316.
- (69) *Rochaix* e *Dufourt A.* - Remarques sur la réaction du neutral-toth. «C. R. de la Soc. de Biologie», 1910, 29 octobre.
- (70) *Ruchhoft C. C.*, *Kallas I. G.*, *Chinn B.*, and *Coulter E. W.* - Coli-aerogenes differentiation in water analysis. I-II. «Journ. Bact.», 1931, 21, 407 e 22, 125.
- (71) *Stark C. N.* and *England C. W.* - Formate ricinoleate broth a new medium for the detection of Colon-organisms in water and milk. «Journ. Bact.», 1935, 29, 26.
- (72) *Stark C. N.* and *Curtis L. R.* - Evaluation of certain media for the detection of colon organisms in milk. «Am. Journ. of Publ. Health», 1936, 26, 354.
- (73) *Stark C. N.* and *Curtis L. R.* - A critical study of some media used for the detection of colon organisms in water and milk. «Journ. Bact.», 1935, 29, 27.
- (74) *Sherman I. M.* and *Wing H. U.* - The significance of colon Bacteria in milk, with special reference to standards. «Journ. Dairy Sci», 1933, 16, 165.

- (75) *Shunk I. V.* - Comparative studies of presumptive test media for the Coli-aerogenes group of bacteria. « Journ. Bact. », 1935, 29, 163.
- (76) *Syrocki A. V., Fuller I. E. and France R. L.* - Acid production by the Escherichia-Aerobacter group of Bacteria as indicated by dissolved metallic Iron. « Journ. Bact. », 1937, 33, 185.
- (77) *Singer E.*- Bacterium Coli im Wasser. « Zentrabl. f. Bakter ». Ab. I, 1932, 124, 32.
- (78) *Standard Methods of Milk Analysis.* - « Amer. Publ. Health Ass. » New York, 1934.
- (79) *Salle A. J.* - A system for the bacteriological analysis of water. « Journ. Bact. », 1930, 20, 381.
- (80) *Swenarton J. C.* - Can B. coli be used as an index of the proper pasteurization of milk. « Journ. Bact. », 1927, 13, 419.
- (81) *Vassileff T.* - Recherche et numération du coli-bacille dans le lait par la méthode du rouge neutre. « Le Lait », 1932, 12, 181.
- (82) *Van der Reis.* - Die Wirkung menschlicher und tierischer Galle auf Bakterien. « Zentrabl. f. Bakter ». I. Abt., 1921, 86, 337.
- (83) *Vaughn R. and Levine M.* - Effect of temperature and boric acid on gas production in the colon group. « Journ. Bact. », 1935, 29, 24.
- (84) *Werkman C. H.* - An improved technic for the Voges-Proskauer test. « Journ. Bact. », 1930, 20, 121.
- (85) *Williams O. B. and Morow M. B.* - The bacterial destruction of acethylmethylcarbinol. « Journ. Bact. », 1928, 16, 43.
- (86) *Wilson G. S.* - «The bacteriological gradipg of milk », 1935, p. 174.
- (87) *Yale M. W.* - Comparison of solid with liquid media as a means of determining the presence of lactose fermenting bacteria in pasteurized milk. « Amer. Journ. Publ. Health », 1937, 27, 564.
- (88) *Yale M. W.* - Confirmation of test for the Escherichia-Aerobacter group in pasteurized milk. « Journ. Bact. », 1937, 33, 449.
- (89) *Yale M. W.* - The Escherichia-Aerobacter Group of Bacteria in Dairy Products. « Journ. Dairy Sci », 1933, 16, 481.
- (90) *Zavagli V.* - I germi del gruppo Coli-aerogenes nel latte. «Annali d'Igiene », 1933, Anno XLIII, fasc. I.