

Ricerche su un fermento lattico sporigeno (*Bac. thermoacidificans*)

Dott. P. Renco

(Ricevuto il 14 aprile 1942-XX)

Durante le ricerche sulla microflora del siero fermento adoperato nella fabbricazione del formaggio grana, è stato isolato un bastoncino mobile e sporigeno, capace di produrre notevoli quantità di acido lattico da una numerosa serie di zuccheri. Consultando la letteratura sull'argomento si è potuto constatare che solamente un germe presenta alcune caratteristiche affini con il bastoncino in parola, e precisamente il *Bac. lactis termophilus* isolato da Gorini ¹⁾ dal latte sterilizzato del commercio. Quest'ultimo, pure essendo un bacillo sporigeno capace di acidificare il latte, presenta alcuni caratteri completamenti diversi da quelli riscontrati per il bacillo isolato dallo scrivente. Tali differenze si notano soprattutto nella mobilità, nell'aspetto delle colonie sull'agar e sulla patata, nel coagulo del latte, nelle temperature di sviluppo e nella forma delle spore ²⁾.

Si crede perciò opportuno di rilevare i principali caratteri del bacillo isolato onde poterlo classificare.

Forma. - Sull'agar brodo e agar siero-peptone si presenta sotto forma di bastoncini di $0,6 - 0,8 \times 2,4 - 9 \mu$ (la lunghezza più comune è di $7-8 \mu$), isolati o riuniti a due a due. Assai spesso, ed in particolar modo sull'agar siero peptone, forma corti filamenti un po' ricurvi che misurano circa $16-24 \mu$. E' mobile, ma in tutte le culture solo poche cellule presentano movimenti piuttosto lenti. La colorazione delle ciglia risulta alquanto difficile, però con il metodo de' Rossi si riesce a mettere in evidenza bastoncini peritrichi muniti di poche ciglia. È Gram positivo.

In tutti i più comuni terreni nutritivi forma le spore, assai facilmente rilevabili, specialmente nelle colonie superficiali su agar-brodo. Le spore sono ovali, più grosse del bastoncino e sempre terminali, dando luogo a caratteristiche forme di plectridio. Le forme rimangono pressochè costanti in tutti i comuni terreni nutritivi. Ciò è stato messo in evidenza particolarmente facendo delle colorazioni negative con bleu di china. Per tale scopo si portava su un vetrino sgrassato un'ansata di acqua, colla quale

1) Gorini C. - Studio critico-sperimentale sulla sterilizzazione del latte. Stab. G. Ci-velli, Milano, 1894.

2) Non si è potuto constatare l'eventuale esistenza degli altri caratteri differenziali, come per es. la capacità fermentativa sugli zuccheri, la qualità e quantità degli acidi prodotti, la produzione dell'indolo e della catalasi, non essendo riportati detti caratteri nella pubblicazione del Prof. Gorini, gentilmente offertami. Né si sono potute fare ricerche comparative per la mancanza di culture di *Bac. lactis termophilus*.

si mescolava un po' del materiale della colonia in esame; senza lasciare asciugare si aggiungeva coll'ansa un po' della soluzione di bleu di china al 5%, si distribuiva sul vetrino in modo di formare zone più o meno scure. Si seccava all'aria o a 40-50° C e si montava con balsamo.

Il preparato riprodotto nella figura n. 1 è stato ottenuto nel modo sopraindicato.

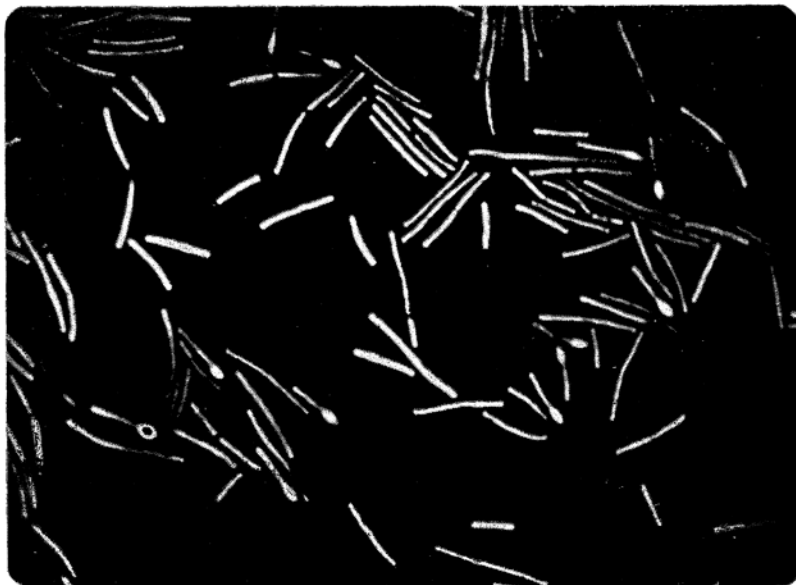


Fig. 1 - *Bac. thermoacidificans* dalle colonie su agar brodo di 3 giorni a 45° C. Colorazione con bleu di china. Ingr. 1900.

Gelatina. - Sono state allestite culture per infissione tenendole in incubazione alle temperatura di 20-21°, 30°, 40°, 45°, 50° e 55° C. A 20-21° C. si è potuto osservare un leggero sviluppo dopo 8 giorni lungo tutto il canale d'innesto. Dopo 15 giorni raggiunto il massimo sviluppo l'innesto si presentava a forma di sottile chiodo di color bianco-sporco. Anche dopo un mese non si è potuta constatare la liquefazione. Alle temperature tra 30° e 55° C il comportamento è stato pressochè uguale, unica differenza consisteva sulla rapidità dello sviluppo. La gelatina liquefatta per alte temperature si intorbida leggermente verso il fondo e fortemente verso la superficie, con formazione di un sottile velo superficiale, in seguito si ebbe la formazione di un deposito non troppo abbondante. Dopo 15 giorni di permanenza in termostato le culture furono tenute per circa 6 ore a 40° C e poi portate alla temperatura d'ambiente. In tutte le provette si ebbe una pronta e completa solidificazione. La gelatina rimase solida anche per altri venti giorni di permanenza alla temperatura di 20-21° C (dopo di che le culture furono abbandonate).

Nelle piastre di gelatina si ebbe la comparsa di colonie dopo 12 giorni circa sotto forma di punticini bianchi appena visibili ad occhio nudo, colonie che dopo altri sette giorni subirono un aumento appena percepibile per poi rimanere stazionarie. Viste al microscopio a 90 x si presentavano perfettamente rotonde con margine liscio di color giallognolo e molto finemente granulose.

Agar brodo — Colonie superficiali a 45° C sono bianco-giallognole semitrasparenti di struttura «cristallina» o granulata. Il diametro può arrivare sino a 4 mm. circa. Talvolta sono rotondeggianti con margini lisci o finemente increspati, talvolta con ramificazioni irregolari filamentose, terminanti a punta. Spesso a 40° C presentano nel centro una zona circolare più o meno trasparente ed uniforme, talvolta molto nitida, talvolta appena accennata (vedi figura n. 2). Visto al microscopio, il centro non appare uniforme come ad occhio nudo, ma sotto forma di chiazze rappresentate dai bastoncini non sporificati in mezzo agli altri sporificati. Le colonie sono ben sviluppate già dopo 24 ore, ma raggiungono il massimo sviluppo dopo 3-4 giorni.

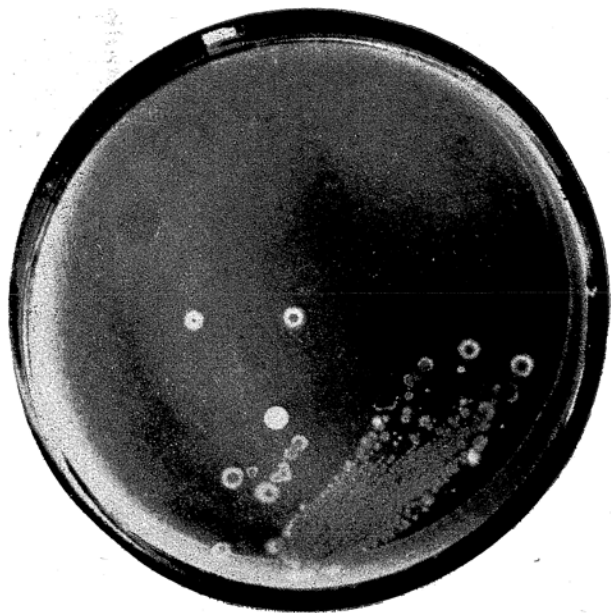


Fig. 2 - Colonie superficiali del *Bac. thermoacidificans* su agar brodo dopo 5 giorni a 40° C.

Agar siero peptone. — Colonie superficiali dopo 24 ore a 45° C raggiungono il diametro di 1-2 mm., sono rotondeggianti con margini lisci, di colore bianco-grigio, trasparenti con struttura uniformemente cristallina o granulosa. Dopo 30 ore aumentano di diametro, diventano più spesse e colorate leggermente in giallo sporco, salvo il margine che rimane

di struttura cristallina semitrasparente. Dopo tre giorni il diametro arriva a 5 mm., il centro per un raggio di 1-2 mm. si fa più spesso ed il colore giallo tende a quello arancio che si fa sempre meno intenso verso il margine che rimane bianchiccio, semitrasparente con struttura cristallina e finemente increspato. Le colonie profonde dopo 3-5 giorni a 40° C, sono rotondeggianti bianco-giallognole, con un diametro che varia da 1/3 - 1/2 mm. circa. Viste a 90 ingrandimenti presentano contorni lobati, sono bitorzolute in modo da assomigliare al frutto del gelso.

Agar latte. — Le colonie, quasi uguali a quelle su agar siero peptone, si circondano di un alone opaco, alone che si allarga nei primi sette-otto giorni e non cambia con il passar del tempo.

Siero peptone. — A 20-21° C dopo 30 giorni non si ebbe alcun sviluppo. Dopo 24 ore a 45° leggero intorbidamento, nei giorni seguenti si forma sul fondo un discreto precipitato grumoso, dal quale risalgono i grumi sulle pareti per qualche centimetro di altezza, grumi che diventano sempre più piccoli sino a scomparire verso la superficie del liquido. Leggerissimo velo superficiale.

Brodo. — Il brodo a 50° C intorbida verso la superficie con un leggerissimo velo di color grigio-biancastro, che si innalza un po' sulle pareti della provetta e che, scuotendo, intorbida la superficie del liquido. Dopo un paio di giorni si ha un discreto deposito granuloso sulle pareti e sul fondo. Il pH rimane immutato. A 20-21° C dopo 30 giorni non si è potuto osservare alcun sviluppo.

Latte tornasolato. — La colorazione scompare entro 48-60 ore, dopo altre 20 ore circa si ha la coagulazione.

Latte magro. — Coagulo compatto e ben consistente senza separazione di siero si verifica in 7 giorni a 30° C, in 3 giorni a 40 e 45° C, in 45 ore a 50° C, in 60 ore a 55° C e in 10 giorni a 58°. A 60° dopo 20 giorni il latte non risulta coagulato. Anche a 25° C non si ha la coagulazione entro 20 giorni.

Le colture in latte emanano un odore caratteristico, non ben definibile e piuttosto poco gradevole. Tale odore permane anche dopo che le culture sono state sottoposte alla ebollizione per un'ora.

Infissione nell'agar siero peptone. — A 45° C dopo 5 giorni si ha nel canale solo un debolissimo sviluppo verso la parte superiore, mentre sulla superficie attorno al punto d'infissione si forma patina di color biancosporco.

Potere fermentativo. — Produce acidità e non gas dai seguenti alcoli e glucidi: glicerina, xilosio, arabinosio, ramnosio, levulosio, glucosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, raffiniosio, destrina, amido e glicerina. Non produce acidità da inulina e mannite.

Patata. — A 40° C dopo 6 giorni si sviluppano colonie a forma di goccia, aventi un diametro di circa un mm. leggermente colorate in gialliccio, nel centro un po' rilevate e un po' più intensamente colorate.

Produzione di acidità. — La massima produzione di acidità viene raggiunta dopo 10 giorni a 40° C che espressa in acido lattico risulta di 0,84 % (detta cifra rappresenta solo l'acidità di fermentazione). Il pH minimo osolla attorno 4,6. Vengono prodotte pure piccole quantità di acidi volatili; (l'acidità volatile è risultata di 0,04 %). Entro sei giorni l'acidità generalmente non supera lo 0,6 %. L'acidità fissa è dovuta all'acido lattico che è stato estratto coll'etere.

Prima dell'estrazione, la cultura in latte magro è stata riscaldata a bagnomaria per circa 20 minuti in modo da favorire la separazione del coagulo dal siero e poi filtrata. 50 cc. del siero acido così ottenuto veniva trattato con 100 cc. di acqua di calce per precipitare gli acidi organici (infuori all'acido lattico). Si allontanava il precipitato colla filtrazione, al filtrato si aggiungeva altri 10 cc. di acqua di calce e si filtrava nuovamente. Ciò si ripeteva sino a che non si aveva più il precipitato. Il filtrato così ottenuto, che si presentava limpidissimo, si evaporava a bagnomaria, previa aggiunta di 2 % di acido solforico, concentrandolo a 30 cc. Detta quantità si versava in un cilindro graduato mentre la capsula usata per la evaporazione veniva lavata in due riprese coll'acqua distillata in modo di raggiungere nuovamente il volume primitivo, cioè 50 cc.

Il siero così trattato risultava privato di acidi volatili ed altri acidi organici liberi capaci di falsare la ricerca dell'acido lattico. Per estrarre l'acido lattico si sbatteva energicamente 10 cc. del liquido così trattato con 100 cc. di etere, si lasciava a riposo per 10', si decantava e si evaporava l'etere e titolava l'acidità del residuo.

L'acidità titolata del residuo così ottenuto, dopo otto o nove estrazioni (cioè finchè il residuo non si presentava quasi neutro) era pressochè uguale a quella fissa di fermentazione della cultura in latte magro. Il che autorizza dedurre che l'acidità prodotta nelle culture di latte magro è dovuta quasi esclusivamente all'acido lattico.

Resistenza delle spore. — Le culture ricche di spore seminate nel latte magro resistono per un minuto primo a 100° C, mentre vengono distrutte alla stessa temperatura in tre minuti primi.

Indolo. — Sono state allestite culture in brodo ed in acqua peptonata. Indolo è stato ricercato con il reattivo di Kovács ¹⁾ (paradimetilaminobenzaldeide, alcool amilico e acido cloridrico) dopo due e cinque giorni di incubazione a 45° C. Il brodo è stato preventivamente privato di zucchero facendovi sviluppare un ceppo del Bact. aerogenes (incapace di produrre indolo) e poi nuovamente sterilizzato. In tutti i casi la reazione fu nettamente negativa.

Catalasi. — Nelle provette della capacità di circa 20 cm³ sono state allestite le culture in latte magro contenutovi in ragione di 10 cm³ per provetta. Dopo 5 giorni di incubazione a 45° C si eseguiva la ricerca della catalasi nel seguente modo: nella stessa provetta la cultura veniva ener-

¹⁾ Kovács, N. - Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. Zeitschr. f. Imm. und Exp. Therap. 1928, 55, 311.

gicamente agitata dopo l'aggiunta di circa 5 cm³ di acqua per renderla ben liquida ed omogenea, poi si versava, sino a ricoprire quasi totalmente la provetta, l'acqua ossigenata al 3,6% (12 vol.), dopo una breve e rapida agitazione si chiudeva con un tappo di gomma forato portante un tubicino di vetro piegato ad S onde permettere sfuggire il liquido spostato dall'ossigeno formatosi nella provetta capovolta. Si è potuto constatare sempre che entro 10-15 minuti veniva liberato tanto ossigeno da riempire più di 4/5 della provetta.

Da quanto è stato esposto risulta che sin'ora non è stato descritto alcun germe avente i caratteri indicati. Si propone perciò la seguente denominazione: *Bacillus thermoacidificans*. Detto bacillo può essere classificato, seguendo Bergey, nel Genere: *Bacillus* (Cohn 1872). Famiglia: *Bacillaceae* (Fischer 1895) e Ordine: *Eubacteriales* (Buchanan 1917).

RIASSUNTO

Si descrive un bacillo lattico mobile e sporigeno isolato dal siero fermento del formaggio grana, che è da considerarsi, per la sua forma e per lo sviluppo ad alte temperature, un plectridio termofilo.

Il bacillo in parola produce acidità da numerosi zuccheri ed alcoli; acidità, che raggiunge nel latte magro 0,84% ed è dovuta quasi esclusivamente all'acido lattico.

Non essendo identificabile con nessuna altra specie sin'ora descritta, l'Autore propone la denominazione di *Bac. thermoacidificans*.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein beweglicher, sporogener Milchbazillus beschrieben, welcher aus dem Serumferment des Granakäses isoliert worden ist und der nach seiner Form und seiner Fähigkeit sich in Gegenwart hoher Temperaturen zu entwickeln, als ein thermophiles Plectridium anzusehen ist.

Aus mehreren Zuckerarten und Alkoholen bildet der in Frage kommende Bazillus Säuremengen die für Magermilch 0.84% betragen und fast ausschliesslich aus Milchsäure stammen. Da er mit keiner der bis jetzt beschriebenen Arten identifizierbar ist, schlägt Verf. die Benennung *Bac. thermoacidificans* vor.