

Ricerche sugli schizomiceti anaerobi putrefacenti sporigeni

Dott. Isidoro Politi - Lib. docente

(Ricevuto il 28 Marzo 1943-XX)

Nota I

L'importanza degli schizomiceti anaerobi sporigeni nei processi di decomposizione cui soggiacciono le sostanze azotate contenute nei prodotti alimentari è ben nota specialmente per quanto riguarda gli alimenti di origine animale, costituiti prevalentemente da proteine e con trascurabili contenuti in idrato di carbonio. Viceversa, nel quadro delle complesse trasformazioni fermentative interessanti da un lato i prodotti vegetali in genere e dall'altro il latte, ossia gli alimenti che contengono notevoli quantità di sostanze idrocarbonate, l'importanza competente ai predetti microrganismi spesso sfugge di fronte a quella attribuita ad altri gruppi microbici che si sviluppano in modo più intenso e palese perché maggiormente favoriti dalle condizioni fisico-chimiche del substrato. Pertanto le ricerche sui microrganismi putrefacenti anaerobici di codesti materiali sono piuttosto limitate, mentre si è attribuita molta importanza ai cosiddetti fermenti butirrici che per lo più vengono considerati come i principali responsabili dei processi di alterazione anaerobica dei foraggi insilati e di talune alterazioni dei predetti caseari. In alcuni casi con la denominazione di fermenti butirrici si è forse inteso designare tutto il gruppo degli anaerobi sporigeni, ma logicamente una distinzione in proposito si impone date le importanti differenze esistenti fra i fermenti butirrici veri e propri, i quali agiscono essenzialmente sulle sostanze idrocarbonate, ed i putrefacenti che intaccano prevalentemente le sostanze azotate.

Per codeste ragioni si è creduto utile istituire una serie di indagini sistematiche sull'argomento ed in questa nota si espongono i risultati di un primo nucleo di ricerche le quali, oltre la elaborazione dei metodi e lo studio di alcuni ceppi, compresero il riconoscimento della presenza di detti microrganismi in numerosi foraggi insilati ed in alcuni formaggi.

Tecnica culturale. — Geme è noto, per la ricerca dei batteri putrefacenti anaerobi sporigeni in genere si impiegano terreni diversi ricchi di sostanze azotate (latte, brodo comune o glucosato, brodi speciali), pastorizzando di solito e mantenendo in condizioni anaerobiche con particolari dispositivi od accorgimenti. Nelle nostre ricerche, dato che si trattava di esaminare dei

materiali che accanto agli eventuali putrefacenti contenevano o potevano contenere in elevato numero dei microrganismi sporigeni scarsamente attivi sulle sostanze azotate e dotati di potere acidogeno, si è pensato di preferire terreni colturali il più possibile privi di zuccheri. Le prove preliminari all'uopo effettuate dimostrarono che lo scopo poteva essere agevolmente raggiunto mediante l'impiego di semplice acqua peptonata per gli arricchimenti e del relativo agar per le colture di isolamento in piastre. La tecnica adottata può essere così riassunta:

a) colture di arricchimento. Si impiegano provette di acqua peptonata solfidrata al momento mediante addizione di cc. 0,2 di soluzione sterile di solfuro sodico all'1 % in NaOH N/4 e quindi di H₂SO₄ 0,1 N, pure sterile, nella quantità necessaria per la neutralizzazione. La semina si fa in provette contenenti 2 cc. di paraffina sterile; vi si travasa sterilmente l'acqua peptonata, si pastorizza a 80°C. per 5-10 minuti, si raffredda e si pone in tenno-stato. Lo sviluppo dei putrefacenti è denunciato da intorbidamento, spesso da sviluppo di gas e, dopo rimozione del tappo di paraffina, da intenso odore sgradevole.

Con semine quantitative e diluizioni decrescenti si può determinare la quantità approssimativa delle spore contenute nel materiale in esame.

b) *Culture di isolamento.* Si allestiscono con differenti diluizioni delle piastre per diffusione, impiegando come terreno colturale l'agar all'acqua peptonata, preferibilmente di recente sterilizzazione, solfidrato al momento dell'uso nel modo anzidetto. Si sistemano le piastre in apparecchio per colture anaerobiche, si fa il vuoto, 1-2 lavaggi con idrogeno e si mantiene in termostato a 37° per 3-4 giorni. L'isolamento si può quindi fare in acqua peptonata, oppure anche in latte, brodi ecc.

Se l'apparecchio, oltre che a perfetta tenuta è tale per cui sulla superficie interna dei coperchi delle scatole non si verifica una eccessiva condensazione di acqua e nello stesso tempo non determina un eccessivo prosciugamento dell'agar, si ottengono facilmente delle colture da cui è possibile effettuare gli isolamenti con la stessa probabilità di purezza che si ha nei comuni isolamenti a mezzo di piastre aerobiche. Applicando bene la precedente tecnica, in dati casi si possono fare anche delle determinazioni quantitative mediante conteggio delle colonie. (*)

Ricerca nei foraggi insilati. — Applicando la precedente tecnica nell'esame di numerosi foraggi insilati in differente stato di conservazione, è stato agevole riconoscere la frequentissima presenza degli anaerobi putrefacenti sporificati. Le proporzioni sono risultate molto variabili: Dal risultato negativo per la diluizione corrispondente a 1/10 di gr., sino ad esito positivo per la diluizione corrispondente ad 1/10.000 o meno di gr. di foraggio; cioè in proporzioni dello stesso ordine di grandezza di quelle corrispondenti alla presenza degli anaerobi gasogeni (fermenti butirrici) che si ricercano solitamente mediante l'impiego di latte.

(*) Si presta bene allo scopo l'apparecchio descritto dallo scrivente (1): le piastre possono essere sistemate l'una sull'altra non capovolte, entro un grosso bicchiere su cui si disporrà un coperchio di scatola Petri grande.

Nel corso dei predetti controlli si sono pure allestite delle piastre di isolamento, ottenendo allo stato di sicura purezza alcuni ceppi dei quali vennero rilevati i principali caratteri morfologici culturali e fermentativi. Essi risultarono differenziabili in due tipi i cui caratteri corrispondono a quelli dei due ceppi sotto descritti.

CEPPO I

Caratteri morfologici. — In brodo comune e glucosato: bastoncini con estremità poco arrotondate di $0,5-0,6 \times 2-5 \mu$, isolati od in catenelle di 2-4 elementi. In latte digerito la larghezza è di circa $0,8 \mu$. Forma spore ovali, centrali o subterminali, di poco più grosse del corpo microbico che non è deformato. Spesso capsulato. Gram positivo.

Caratteri fisiologici e culturali. — Anaerobio obbligato. La temperatura ottima è di circa 37° ; lento sviluppo a 20° , buono a 44° C.

Brodo comune. — Buon sviluppo con intorbidamento e poco gas; dopo alcuni giorni il brodo ritorna limpido essendosi formato un deposito che per agitazione appare mucoso.

Acqua peptonata. — Crescita abbastanza intensa con leggera produzione di gas. Il deposito si sospende uniformemente.

Latte. — Non si osserva evidente coagulazione, ma proteolisi diretta e produzione di gas. La caseina risulta degradata quasi completamente dopo due tre giorni ed il liquido assume una tinta giallo ambra.

Brodo cervello (Rosenow). — Forte sviluppo con abbondante produzione di gas. Non si ha annerimento.

Agar sangue. — Si formano colonie confluenti ai lati della linea di striscio, poco rilevate (maggiormente nella parte centrale), un po' lucide, con margini pressoché interi e di forma quasi circolare. Non si osserva emolisi.

Siero di sangue coagulato. — Forte fluidificazione con colorazione grigio-verdastra.

Infissione in agar fegato. — Abbondante crescita in profondità con gemmazioni laterali; l'agar subisce delle spaccature ed un iscurimento bruno verdastro.

Agar-acqua peptonata. — In piastre anaerobiche per diffusione forma colonie di circa un millimetro di diametro con gemmazioni periferiche.

Fermenta con leggera acidificazione e sviluppo di gas: glucosio, levulosio, mannosio, maltosio e glicerina. Non fermenta galattosio, saccarosio, lattosio, arabinosio, xilosio, mannite.

Fluidifica la gelatina.

Produce indolo ed ingenti quantità di ammoniaca. Dà odore fetido in tutti i terreni.

Non riduce i nitrati.

CEPPO II

Caratteri morfologici. — Bastoncini di circa $0,4 \times 2-5 \mu$, più raramente sino a 8μ , per lo più isolati. Forma spore terminali un po' più grosse del corpo microbico che non viene deformato e capsula mucosa. Mobile. Gram positivo, per quanto non decisamente.

Caratteri colturali e fisiologici. — Sono gli stessi del Ceppo I eccettuate le seguenti differenze:

Agar sangue. — Crescita con formazione di patina discretamente spessa, un po' granulosa e brillante ai margini; oppure con formazione di colonie di 2-3 mm. di diametro con il centro un po' rilevato, finemente granulose e crenate ai margini. Non si osserva emolisi.

Siero di sangue coagulato. — Formazione di leggera patina senza fluidificazione nè iscurimenti.

Infissione in agar fegato. — Abbondante crescita in profondità con piccole e fitte gemmazioni laterali. L'agar subisce alcune spaccature per produzione di poco gas ma non iscurisce.

In virtù dei caratteri rilevati il Ceppo I appare molto simile al *Clostridium bifermentans* Tissier e Martelly (*Bacillus bifermentans sporogenes* Tissier) con il quale viene identificato. (2. 3) Alla stessa specie si avvicina pure per gran parte dei caratteri colturali e fermentativi anche il Ceppo II che differisce dal precedente principalmente dal punto di vista morfologico e per la incapacità di fluidificare l'albumina di sangue. E' però presumibile che anche il ceppo II appartenga alla predetta specie o costituisca una varietà della medesima.

I risultati precedentemente esposti autorizzano a concludere che gli anaerobi sporigeni possono svolgere intense azioni degradative sulle sostanze proteiche allorchè i foraggi ammassati nei sili non soggiacciono con sufficiente rapidità ai noti processi di acidificazione ai quali è subordinato il buon esito della conservazione. In base alle risultanze delle nostre precedenti ricerche (4), si è anzi indotti a ritenere che gli schizomiceti sopra descritti, o dello stesso tipo, rappresentino i principali responsabili dei processi più gravi di degradazione dei componenti azotati dei foraggi. Si tratta infatti di germi dotati di energiche attività proteolitiche ed ammonizzanti che trovano condizioni favorevoli di sviluppo non solo nei substrati a base di proteine animali, ma anche nei succhi vegetali, come del resto è stato accertato sperimentalmente. I germi medesimi devono essere tenuti presenti anche dal punto di vista dell'igiene zootecnica; essi infatti appartengono ad un gruppo comprendente varie specie microbiche i cui prodotti metabolici presentano notoriamente proprietà più o meno intensamente tossiche.

Ricerca nei formaggi. — La frequentissima presenza dei putrefacenti anaerobi sporigeni nei formaggi insilati, e specialmente in quelli con esito non ottimo, ha consentito di porre il quesito della eventuale sfavorevole influenza dei germi medesimi, nei confronti degli inquinamenti batterici del latte, in modo analogo a quanto si è concordi ad ammettere per i fermenti butirrici veri e propri. Tale supposizione già a priori appare fondata giacchè si tratta di microrganismi dotati ad un tempo di intense azioni sulle sostanze azotate e di potere gasogeno, atti a trovare nel latte e nei derivati caseari condizioni di sviluppo molto favorevoli. Pertanto si è pensato di istituire delle indagini sistematiche appunto al fine di confermare la precedente supposizione ed affrontare con nuovi criteri il complesso problema di talune alterazioni dei formaggi.

Le indagini vennero iniziate approfittando di una esperienza di alimentazione di bovini da latte con foraggi insilati allo stato verde in cumuli all'aperto, esperienza che venne estesa all'accertamento dell'influenza degli insilati medesimi sulle attitudini casearie del latte. Con il latte degli stessi animali, alimentati da prima con erba e fieno e quindi con il silaggio (di esito non del tutto soddisfacente) venne prodotto del formaggio grana: quello di latte normale non ebbe a presentare rimarchevoli alterazioni o difetti, mentre le forme prodotte con latte-silo risultarono difettose per sfoglie interne, odore di silo e sapore non gradevole decisamente amarognolo. Furono prelevati dei campioni procedendo quindi alla ricerca dei putrefacenti anaerobi sporificati. A tal fine un grammo di pasta, prelevato asepticamente dalla parte interna del campione, venne spappolato in mortaio sterile con 10 cc. di acqua sterile; la sospensione così ottenuta venne distribuita in provette di paraffina in proporzioni corrispondenti a gr. 0,5, 0,1, 0,01 di formaggio. Si aggiunsero 10 cc. di acqua peptonata per provetta e dopo pastorizzazione si mantenne in termostato a 37°C. Si ebbero i seguenti esiti:

Formaggio grana normale: positiva solo la prova con gr. 0,5.

Formaggio grana di latte-silo: positive tutte le prove.

Gli anaerobi putrefacenti sporigeni risultarono cioè presenti anche nel formaggio normale ma le proporzioni di essi furono ben maggiori nel formaggio di latte-silo, manifestamente alterato.

L'esperienza non offre elementi per giudicare se i predetti germi debbano essere considerati come responsabili delle sfoglie o semplicemente degli altri caratteri di alterazione; così pure non consente di rispondere al quesito se la sfavorevole influenza dell'alimentazione con foraggi insilati si sia esplicata attraverso semplice contaminazione oppure, in parte o prevalentemente, anche attraverso una modificazione delle proprietà fermentative del latte. Ma la partecipazione degli anaerobi putrefacenti non può essere posta in dubbio e ciò conferma la supposizione che si era fatta al riguardo e induce a proseguire le ricerche secondo il criterio che da essa emerge. Particolarmente interessante sarà perciò indagare anche in merito all'intervento dei putrefacenti nei fenomeni di gonfiore tardivo ed agli eventuali loro rapporti di simbiosi con i fermenti butirrici, nell'intento di stabilire l'importanza spettante ai due gruppi microbici. La partecipazione degli anaerobi putrefacenti nei fenomeni del gonfiore è un fatto già noto ma la responsabilità maggiore è stata attribuita ai fermenti butirrici; donde appunto l'opportunità di sviluppare convenientemente le ricerche anche al fine di addivenire alla precisazione degli accorgimenti atti ad evitare così frequente e dannosa alterazione dei formaggi.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Unterluchung vieler Proben hat sich die häufige Anwesenheit der sporenbildenden, fäulnisserregenden Anaeroben im ensilierten Futter ergeben. Dieser Gehalt hat sich im Verhältnis als höchst veränderlich bewiesen (bis zu 10.000 Sporen und mehr pro gr.).

Es werden die Merkmale von zwei Stämmen beschrieben, welche in reiner Kultur isoliert worden sind. Diese Keime üben auf mehrere Proteinen, unter Bildung von Gas, Gestank und grosser mengen Ammoniak, energische Zerlegungstätigkeiten aus. Sie vergären auch einige Zuckarten unter Gas - und Säurebildung. Sie gehören zur Art *Clostridium bifermentans* Tissier und Martelly.

Die Untersuchung wurde auch auf Käseerprodukte ausgedehnt und die Gegenwart von Keimen dieser Art wurde festgestellt: bei einem normalem Granakäse der aus Mikh von mit Gras und Heu ernährten Tieren gewonnen worden war und, jedoch in grösserem Masstab, bei einem Granakäse welcher in derselben Fabrik erzeugt wurde und zwar, mit Milch derselben Tiere, die aber mit ensiliertem Futter ernährt worden waren. Dieser zweite Käse war alteriert (innerliche Blättchen, Silogeruch und unangenehmer bitterlicher Geschmack).

Die fäulniserregenden Anaëroben dieser Art sind zweifelsohne die schädlichsten Agenten der veränderungen schlecht gelungener Ensilierungen und stellen auch eine Gefahr für die Milch dar. Wahrscheinlich sind ihre Stoffwechselprodukte für die Tiere schädlich und man muss wohl annehmen dass ihre Entwicklung die hauptsächlichste Ursache einiger Käseveränderungen darstellt.

BIBLIOGRAFIA

1. *I. Politi* - Un semplice apparecchio per colture anaerobiche. (Atti del VI Congr. Naz. di Microb., Milano 1937).
2. *M. Jungano et A. Distaso*. - Les anaerobies. Masson et C., Paris, 1910.
3. *A. Azz.* - Microbiologia e Immunologia. - Vallardi, Milano, 1938.
4. *C. Arnaudi e I. Politi*. - Trasformazioni biochimiche dei foraggi insilati e conseguenze pratiche. (Annali di Microbiologia, vol. II, fasc. V. 1942).