

36. ATTIVITÀ FERMENTATIVA E CARICA BATTERICA DEI FERMENTI LATTICI.

Ho voluto seguire per un lungo periodo di tempo 14 serie di uno stesso fermento lattico, preparato e messo in commercio da una ditta industriale.

Tutte le ricerche che sistematicamente vengono fatte per ogni fermento, specialmente alla loro scadenza portata da una recente ordinanza Ministeriale al sesto mese dalla data di preparazione, furono da me eseguite mese per mese in modo da poter raccogliere numerosi dati obiettivi e comparativi specialmente nei riguardi dell'attività fermentativa e della carica batterica che potrebbero essere utili per una migliore valutazione del controllo stesso.

Tale è quindi, lo scopo di questa mia ricerca sui numerosi controlli iniziati nel mese di aprile e portati mese per mese fino ed oltre la scadenza stessa per 11 serie del prodotto in esame e fino alla scadenza per le altre tre serie (V. tabelle).

Le 14 serie del fermento X presentano, rispettivamente, le seguenti date di preparazione e di scadenza:

I.	Data di preparazione:	11-1-1939	—	Data di scadenza:	luglio	1939
II.	» » »	20-1-1939	—	» » »	»	1939
III.	» » »	10-2-1939	—	» » »	agosto	1939
IV.	» » »	20-2-1939	—	» » »	»	1939
V.	» » »	27-2-1939	—	» » »	»	1939
VI.	» » »	7-3-1939	—	» » »	settembre	1939
VII.	» » »	13-3-1939	—	» » »	»	1939
VIII.	» » »	31-3-1939	—	» » »	»	1939
IX.	» » »	10-4-1939	—	» » »	ottobre	1939
X.	» » »	20-4-1939	—	» » »	»	1939
XI.	» » »	28-4-1939	—	» » »	»	1939
XII.	» » »	8-5-1939	—	» » »	novembre	1939
XIII.	» » »	22-5-1939	—	» » »	»	1939
XIV.	» » »	31-5-1939	—	» » »	»	1939

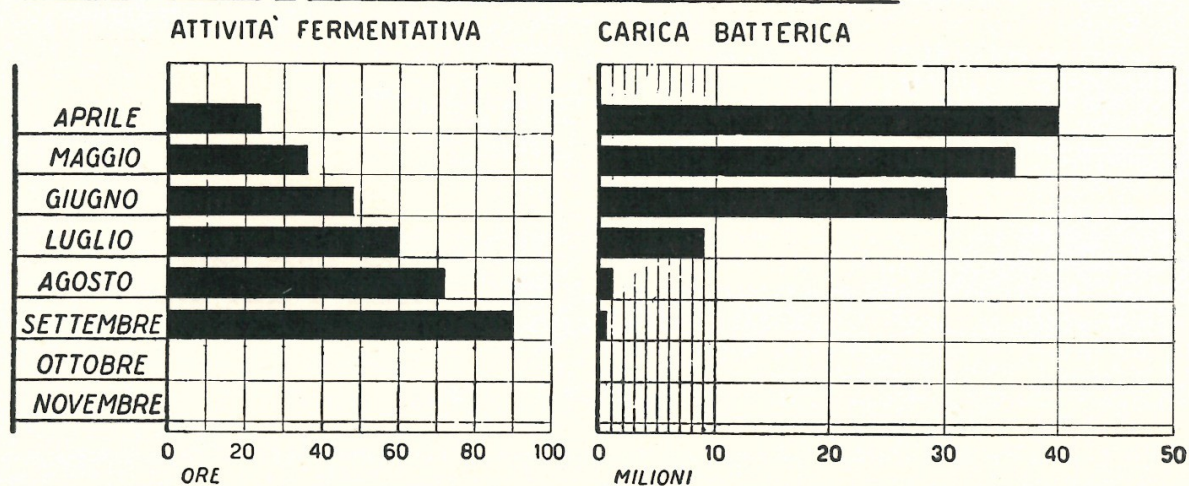
Il prodotto viene messo in commercio in scatole di 12 flaconcini contenenti ognuno 5 cm³ di fermento liquido.

IDENTIFICAZIONE DEL FERMENTO E CONTROLLO DI PUREZZA.

Già col semplice esame batterioscopico è stato possibile rilevare che il prodotto è costituito da una cultura pura monobatterica di lattobacilli in terreno liquido, le principali caratteristiche morfologiche, culturali e biochimiche dei quali sono le seguenti: si presentano sotto forma di sottili e corti bastoncini, raramente ricurvi, di solito diritti, lunghi 0,6-0,7 μ ,

TABELLA I.

CAMPIONE X - Data di preparazione 11-1-1939 - Data di scadenza LUGLIO 1939



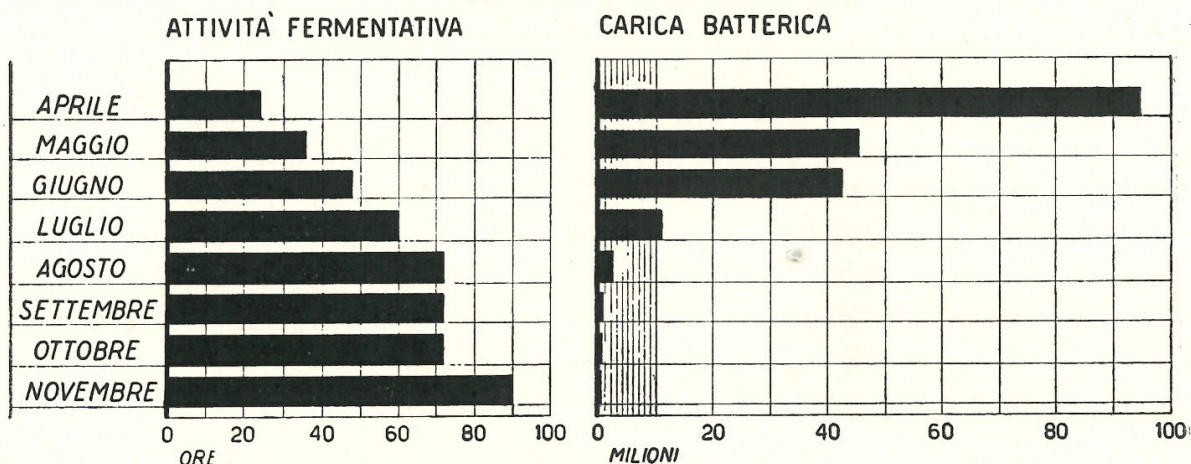
qualcuno perfino 4-7 μ , che si uniscono a formare catene di 2 o 3 elementi sì da fargli assumere la forma strepto-bacillare, oppure riuniti in modo da formare un angolo acuto. Tali disposizioni l'assumono in specie se coltivati in terreni liquidi al maltosio o anche in brodo normale.

Si sviluppa bene in agar glucosato, ma soprattutto in agar maltosato ed in agar lattosato, sotto forma di piccole colonie rotonde od ellittiche, bianche nella loro porzione centrale e quasi trasparenti alla periferia. Tale lattobacillo si sviluppa bene a 36-40°; è di solito presente nel latte, il quale viene spontaneamente acidificato alla temperatura di 48-50° C. La temperatura massima per la produzione di acido si aggira sui 54° C. In modo particolare e facilmente vengono acidificati il maltosio, il destrosio ed il levulosio.

Tale lattobacillo ha affinità cromatiche in genere per tutti i colori basici di anilina ma soprattutto prende bene il Gram. Nei prodotti molto vecchi a volte è sul limite della positività o addirittura gram-negativo.

TABELLA II.

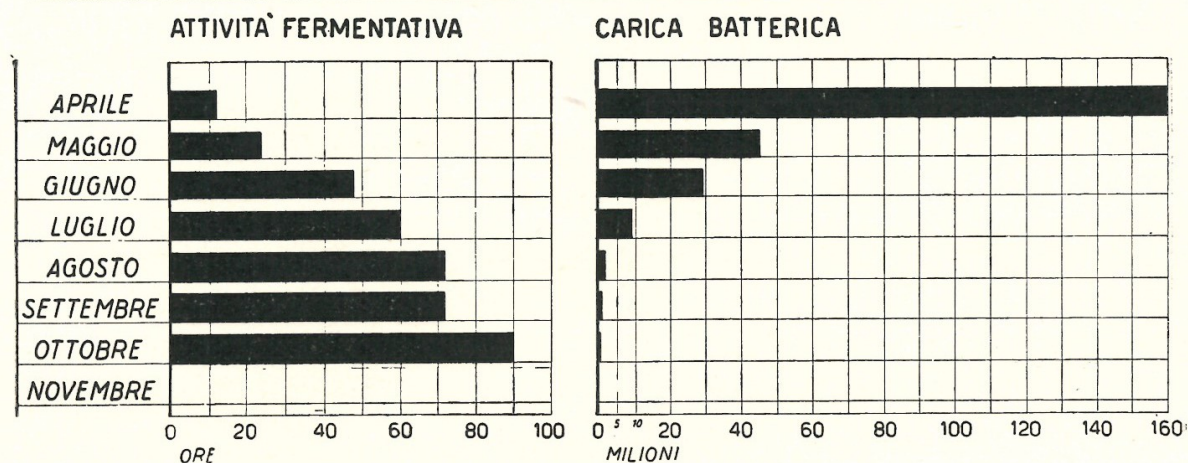
CAMPIONE X — Data di preparazione 20-1-1939 — Data di scadenza LUGLIO 1939



È inoltre immobile ed asporigeno. Per queste sue proprietà morfologiche, culturali, biologiche e cromatiche è possibile identificarlo nel « Bacillus

TABELLA III.

CAMPIONE X — Data di preparazione 10-12-1939 — Data di scadenza AGOSTO 1939



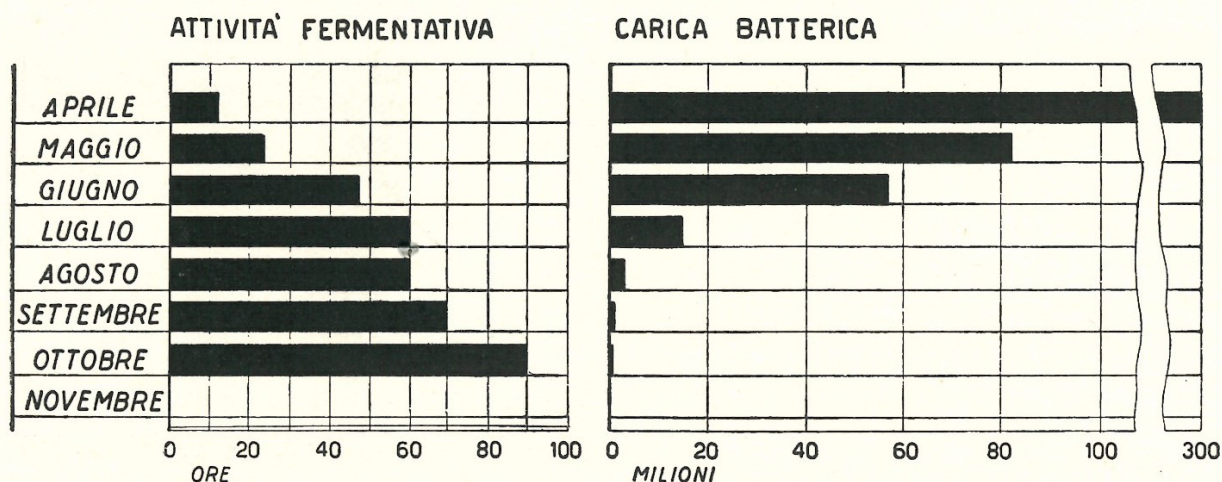
lactis acidi » di Leichmann o meglio ancora nel « Thermobacterium lactis » secondo la più appropriata terminologia dello Jensen.

Il controllo di purezza del fermento, inteso a svelare eventuali inquinamenti specialmente da parte di germi sporigeni del gruppo del

b. subtilis e del *b. mesentericus*, viene fatto seminando abbondantemente (prelevando dal miscuglio del contenuto di diverse fiale) in brodo ed agar comune. Dopo 12-24 h. di termostato a 37°, è possibile rilevare una sot-

TABELLA IV.

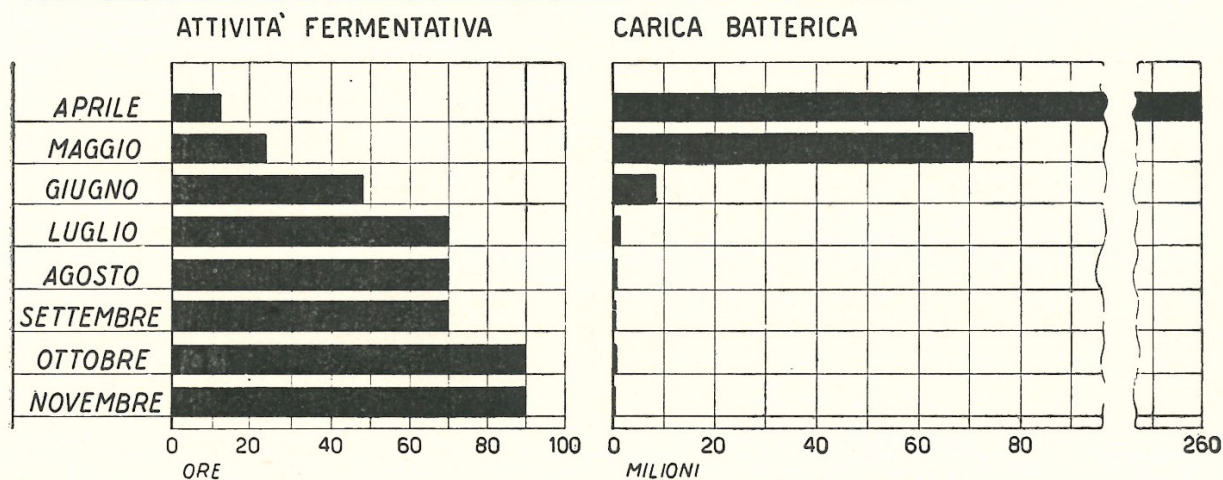
CAMPIONE X — Data di preparazione 20-2-1939 — Data di scadenza AGOSTO 1939



tilissima patina aderente all'agar e l'intorbidamento tenue del brodo. Con l'esame microscopico viene nuovamente confermato lo stato di purezza

TABELLA V.

CAMPIONE X — Data di preparazione 27-2-1939 — Data di scadenza AGOSTO 1939



del fermento, la caratteristica disposizione strepto-bacillare e le affinità cromatiche del lattobacillo che sono proprie del « *Thermobacterium lactis* ».

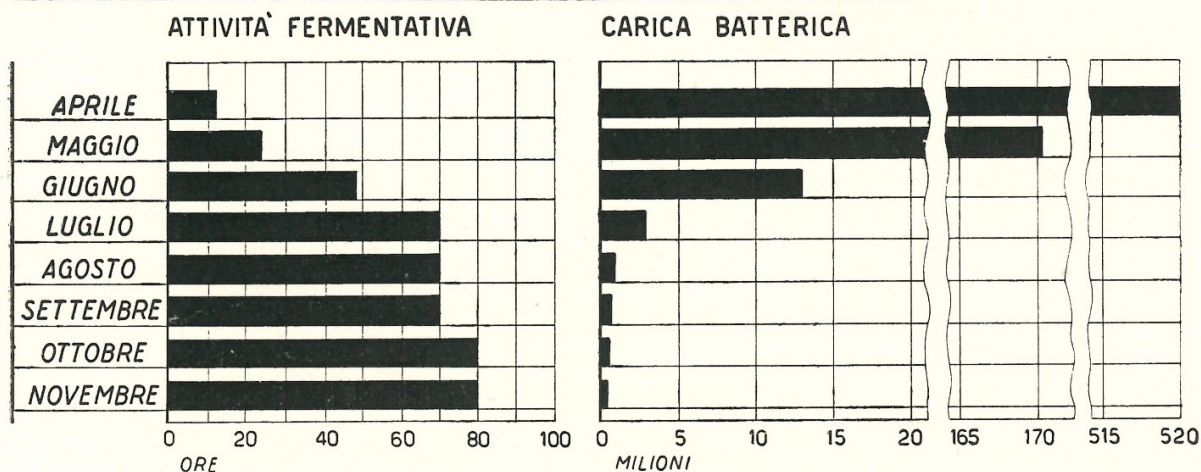
CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ FERMENTATIVA E DELLA CARICA BATTERICA.

Identificato il fermento, ho quindi iniziato, a partire dal mese di aprile, il sistematico controllo dell'attività fermentativa ed il conteggio della carica batterica delle varie serie del prodotto.

Per stabilire l'attività fermentativa seminavo 1 cc. di fermento non diluito, prelevato dal miscuglio di più fiale della stessa serie, in un provettone contenente 20 cc. di latte sterile. Per ogni controllo si seminavano almeno due provettoni che venivano messi in termostato a 37° e si osser-

TABELLA VI.

CAMPIONE X — Data di preparazione 7-3-1939 — Data di scadenza SETTEMBRE 1939



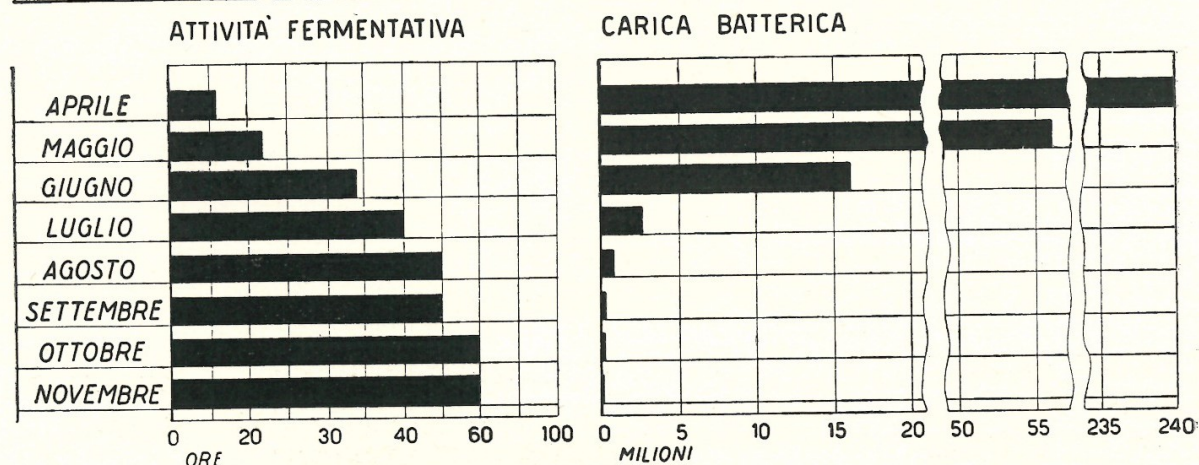
vava il tempo di coagulazione che veniva espresso in ore. Sia l'attività fermentativa che la determinazione della carica batterica vennero determinate ogni mese e precisamente, per la 1^a serie mi sono spinto fino al mese di ottobre e cioè al 9° mese dalla data di preparazione; per la 2^a serie (10° mese dalla data di preparazione), per la 3^a, 4^a, 5^a (9° mese dalla data di preparazione), per la 6^a, 7^a, 8^a (8° mese dalla data di preparazione), per la 9^a, 10^a, 11^a (7° mese dalla data di preparazione) ed infine per la 12^a, 13^a, 14^a (6° mese dalla data di preparazione) fino al mese di novembre.

Dai dati riportati dalle tabelle, si può rilevare che i fermenti di tutte le serie, sono risultati vivi ed attivi alla scadenza dei 6 mesi, dimostrando ancora in tale epoca un'attività fermentativa minima di circa 70 h. (tempo di coagulo di 20 cc. di latte a cui era stato aggiunto 1 cc. di fermento

non diluito) per le serie 3^a e 6^a, e massima di 48 h. per le serie 12^a, 13^a, 14^a dando ancora per queste ultime, parecchi milioni di germi per centimetro cubico. (v. tabelle III, VI, XII, XIII, XIV). Per le serie che mi sono

TABELLA VII.

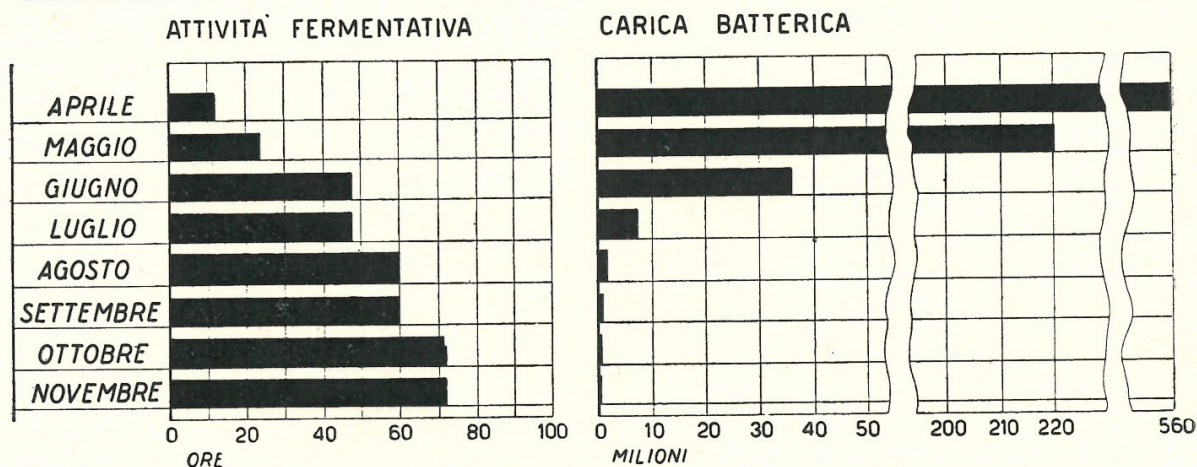
CAMPIONE X — Data di preparazione 13-3-1939 — Data di scadenza SETTEMBRE 1939



spinto a controllare oltre la scadenza, ho potuto notare che per la 1^a e 3^a serie, dopo 3 mesi dalla data di preparazione e per la 4^a serie (8° dalla

TABELLA VIII.

CAMPIONE X — Data di preparazione 31-3-1939 — Data di scadenza SETTEMBRE 1939



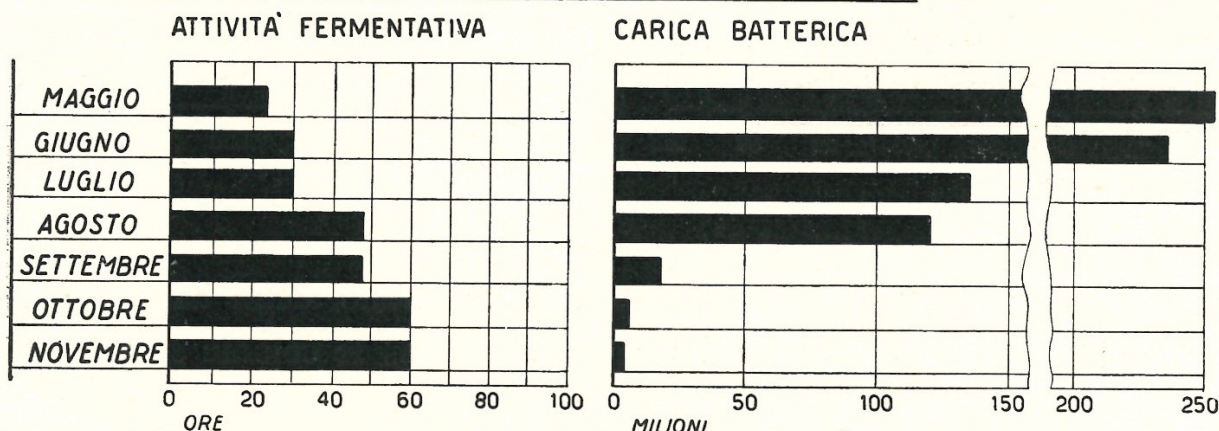
data di preparazione), l'attività fermentativa era ridotta zero (v. tabelle I, III, IV); mentre per le altre serie e precisamente per la 2^a (10° mese dalla data di preparazione), per la 5^a (9° mese dalla data di preparazione), per la 6^a, 7^a, 8^a (8° mese dalla data di preparazione) ed infine per la

9^a, 10^a, 11^a (7° mese dalla data di preparazione) si è potuto rilevare, che pur perdendo gradatamente la loro attività fermentativa, si sono mostrate ancora abbastanza attive e vive (v. tabelle II, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI).

Dunque delle 11 serie, tre su quattro e precisamente la 1^a, 3^a, 4^a controllate al 9° mese dalla data di preparazione sono risultate inattive, mentre una sola, la 2^a serie a 10 mesi dalla data di preparazione si è mostrata ancora abbastanza attiva coagulando il latte in 90 h. e dando ancora una carica batterica di mezzo milione di germi.

TABELLA IX.

CAMPIONE X - Data di preparazione 10-4-1939 - Data di scadenza OTTOBRE 1939



Comunque a giudizio nostro, si devono considerare sufficientemente e sicuramente attive tutte le serie di questo prodotto il cui tempo di coagulo del latte espresso in ore non superi le 72 h., il che in genere avviene fra il 6° ed il 7° mese dalla data di preparazione; quindi dopo tale epoca non si dovranno ritenere i fermenti sufficientemente attivi.

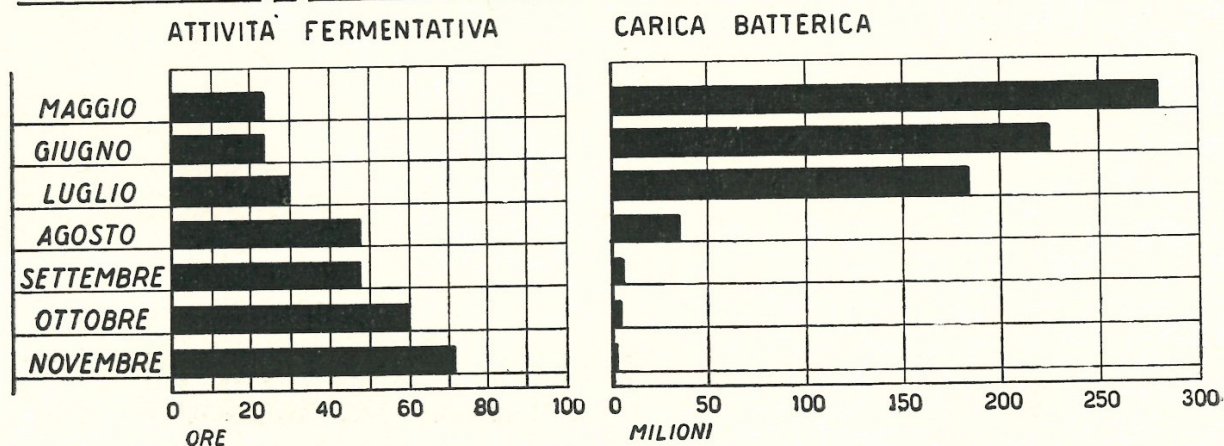
La determinazione mensile della carica batterica di ogni serie fondata sulla conta delle colonie su terreno solido, veniva fatta innanzi tutto preparando le diluizioni del fermento all' 1 : 10.000 e all' 1 : 100.000 usando sempre le bottiglie di Rauper per maggior precisione.

All'inizio ho voluto eseguire le diluizioni in soluzione fisiologica ed in latte, con lo scopo di trarre dati comparativi e per vedere quale dei due metodi rispondesse meglio per precisione e praticità. Ho cercato di usare scrupolosamente la medesima tecnica ed ho allestito diverse piastre con le due su accennate diluizioni, mettendone 1 cc. in piastre Petri; in un secondo tempo versavo il terreno solido ridiscioltto col calore e sfreddato a

45-50° C., mescolavo bene e lasciavo solidificare a bassa temperatura. In tutti i controlli mi sono servito dell'agar lattosato al 2 %, dato che tale terreno è quello in genere impiegato per tale scopo. Ho potuto comunque

TABELLA X.

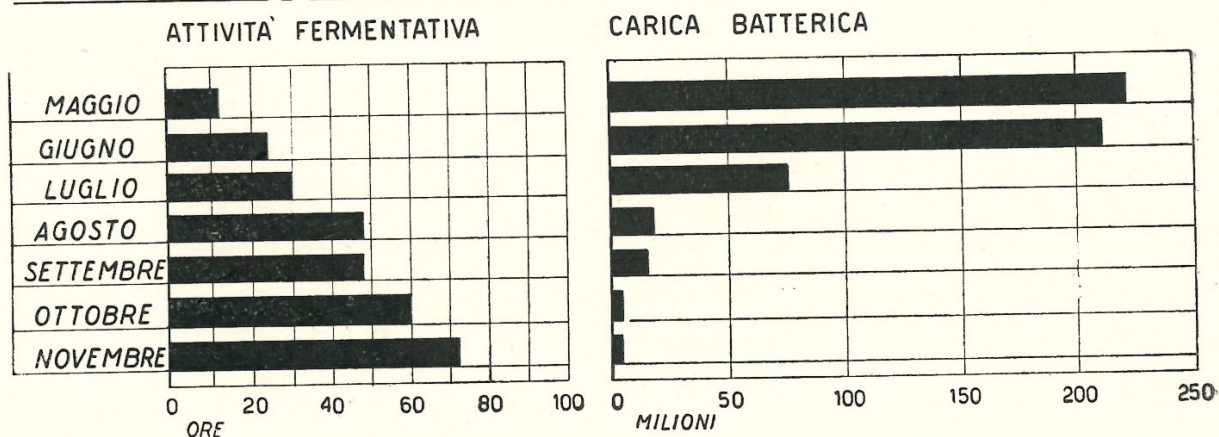
CAMPIONE X — Data di preparazione 20-4-1939 — Data di scadenza OTTOBRE 1939



constatare che le diluizioni in latte non apportavano alcun tangibile miglioramento nè un aumento della carica batterica; le colonie si presenta-

TABELLA XI.

CAMPIONE X — Data di preparazione 28-4-1939 — Data di scadenza OTTOBRE 1939



vano solo un po' più grosse, ma d'altra parte risulta più difficile il conteggio data l'opacità del mezzo a motivo del latte. Le piastre allestite con le diluizioni fatte in soluzione fisiologica, non solo davano presso a poco il medesimo numero di colonie, ma si è sempre riscontrato una minore

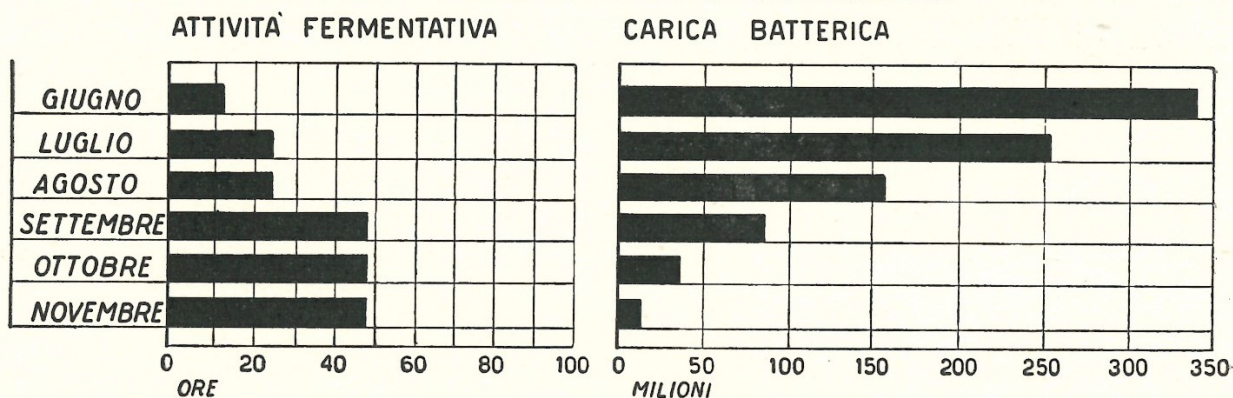
variazione della carica batterica fra la diluizione inferiore e la superiore che non con l'altro metodo.

Le colonie si presentano più piccole (il conteggio va eseguito non prima del 5° giorno di termostato) ma in compenso la conta si eseguisce meglio data la maggior trasparenza del mezzo.

Ho voluto poi provare un metodo misto, ossia eseguire la diluizione in soluzione fisiologica ed aggiungere 1 cc. di latte nella piastra prima di versare l'agar-lattosato. Con questo metodo, come era logico supporre, si sommano i pregi ed i difetti degli altri due; i risultati circa si equi-

TABELLA XII.

CAMPIONE X — Data di preparazione 8-5-1939 — Data di scadenza NOVEMBRE 1939



valgono con i precedenti, s'è solo notato un leggero e costante aumento del numero delle colonie specialmente alla diluizione superiore, forse in relazione al fatto della maggiore esattezza delle diluizioni in soluzione fisiologica essendo un mezzo molto più fluido che non il latte stesso.

Anche con tale metodo si eviterebbe lo spreco inutile e non indifferente di latte.

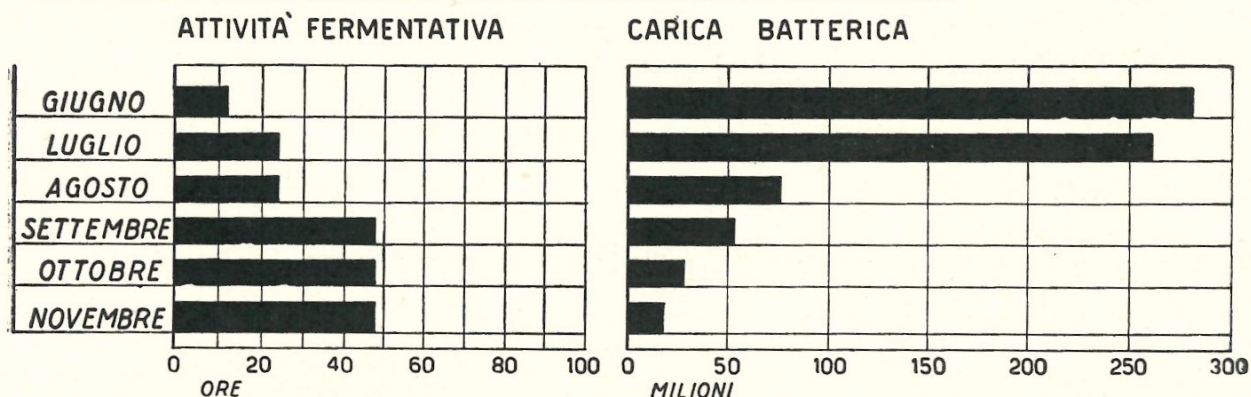
Le piastre venivano quindi capovolte e messe in termostato a 37° C. per 5 giorni, dopo di che si eseguiva l'esame e la conta delle colonie riportando infine con una semplice operazione proporzionale, la quantità delle colonie all'unità di misura adottata, ossia al centimetro cubico.

La determinazione della carica batterica presentò sempre delle difficoltà, in relazione al fatto che da piastra a piastra e da diluizione a diluizione vi sono degli scarti assai sensibili. Tale inconveniente viene in parte superato calcolando la carica batterica sulla media ottenuta dal conteggio dei germi delle diverse piastre. Inoltre mano a mano che il

prodotto s'avvicina alla data di scadenza le colonie crescono stentatamente tanto da non poterle a volte contare; quindi si potrebbe avanzare l'ipotesi che alcuni dei germi tuttora vivi e vitali presenti nel fermento, siano capaci di esplicare ancora l'azione fermentativa nel latte, che è pur

TABELLA XIII.

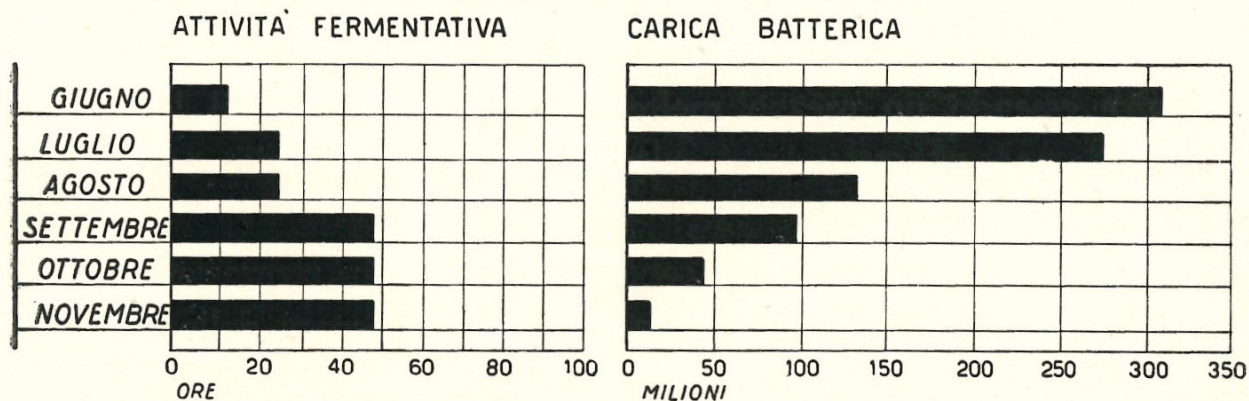
CAMPIONE X — Data di preparazione 22-5-1939 — Data di scadenza NOVEMBRE 1939



sempre il loro terreno di elezione, mentre non riescono a svilupparsi sui terreni solidi, specialmente a diluizioni elevate. Ora, siccome il controllo dei fermenti, va particolarmente eseguito alla scadenza, per i motivi su accennati, risulta come tale prova possa portare ad errori di valutazione.

TABELLA XIV.

CAMPIONE X — Data di preparazione 31-5-1939 — Data di scadenza NOVEMBRE 1939



Dalle tabelle si può ancora rilevare, come pure la carica batterica subisca una certa quale graduale diminuzione mano mano che il prodotto si avvicina alla data di scadenza, non però in modo graduale come avviene per l'attività fermentativa e ciò anche a motivo delle difficoltà che presenta la sua determinazione e che già ho precedentemente accen-

nato. Per le serie 1^a, 3^a (9° mese dalla data di preparazione), e per la 4^a (8° mese dalla data di preparazione), pure la carica batterica è ridotta a zero, mentre per la serie 2^a (10° mese dalla data di preparazione), per la 5^a (9° mese dalla data di preparazione), per la 6^a, 7^a, 8^a (8° mese dalla data di preparazione) e per la 10^a (7° mese dalla data di preparazione), essa si riduce a poche centinaia di migliaia di germi. Per le serie 9^a, 11^a (7° mese dalla data di preparazione) e per le serie 12^a, 13^a, 14^a (6° mese dalla data di preparazione), la carica batterica è ancora di qualche milione di germi (v. tabelle IX, XI, XII, XIII, XIV).

Anche qui si può dire quanto è già stato fatto rilevare per l'attività fermentativa e che cioè tra il 6° ed il 7° mese dalla data di preparazione, è possibile ancora avere una discreta carica batterica, tale da giustificare l'attività del prodotto, mentre dopo tale epoca non si dovrebbe ritenere valido il prodotto in esame. Come si vede esiste una certa proporzionalità, a pari composizione del mezzo, tra carica batterica ed attività fermentativa; faccio però rilevare che vi è un margine molto ampio di oscillazione nella carica batterica, nei confronti dell'attività fermentativa prodotta, per cui si può notare come ad esempio la serie 1^a (la cui carica batterica è di 40 milioni di germi) coaguli il latte in 24 h., ossia nello stesso tempo impiegato dalla serie 2^a (con 95 milioni di germi). Ed ancora la serie 3^a, con 160 milioni di germi, coagula il latte in 12 h. come lo coagulano nello stesso tempo i 560 milioni della serie 8^a.

CONCLUSIONI.

Dall'esposizione di queste mie ricerche e dai dati obbiettivi raccolti, posso affermare e concludere:

1) che il prodotto esaminato è costituito da una cultura pura, liquida, monobatterica di lattobacilli; identificati nel « *Thermobacterium lactis* » (Jensen). Inoltre, i fermenti di tutte le serie, sono risultati vivi ed attivi alla scadenza dei 6 mesi, dimostrando ancora in tale epoca un'attività fermentativa minima di circa 70 h. (tempo di coagulo di 20 cc. di latte a cui era stato aggiunto 1 cc. di fermento non diluito) per le serie 5^a-6^a, e massima di 48 h. per le serie 12^a, 13^a, 14^a, dando ancora per queste ultime, parecchi milioni di germi per centimetro cubico. Per le serie che mi sono spinto a controllare oltre la scadenza, ho potuto notare pre-

cisamente che per la 1^a, 3^a e 4^a l'attività fermentativa era ridotta a zero, mentre le altre serie pur perdendo gradatamente la loro attività fermentativa, si sono mostrate ancora abbastanza attive e vive ma che a parere mio si devono considerare praticamente tali quelle che coagulano il latte non oltre le 72 h. e cioè fra il 6° e 7° mese, dalla data di preparazione;

2) che non ho potuto notare un tangibile miglioramento nella determinazione della carica batterica eseguendo le diluizioni in latte, mentre migliori risultati ho ottenuto col metodo misto, e cioè eseguendo le diluizioni in soluzione fisiologica ed aggiungendo 1 cc. di latte nella piastra prima di versare l'agar-lattosato. Con tale metodo si eviterebbe inoltre lo spreco inutile e non indifferente di latte;

3) che pur essendoci una certa proporzionalità, a pari composizione del mezzo, tra carica batterica ed attività fermentativa vi è pur sempre un margine molto ampio di oscillazione nella carica batterica nei confronti dell'attività fermentativa prodotta;

4) e che infine, per tutto quanto è stato rilevato, ed in considerazione delle difficoltà già accennate che presenta la determinazione della carica batterica, credo opportuno segnalare l'importanza di stabilire esattamente l'attività fermentativa (che deve essere unicamente batterica e per di più propria di fermenti latici) nei confronti della determinazione della carica batterica stessa, considerando invece questa come una semplice prova sussidiaria, al fine di poter dare una più giusta valutazione al controllo stesso.

RIASSUNTO

L'A., ha esaminato 14 serie del fermento X, ne ha controllato mensilmente fino ed oltre scadenza, l'attività fermentativa e la carica batterica, traendone osservazioni e conclusioni dai dati obbiettivi raccolti.

SUMMARIUM

Fermenti cuiusdam lactici quattuordecim series Auctor perscrutatus est: eiusdem singulis mensibus per totum semestrem et amplius vin fermentativam et bacteriorum copiam exploravit: ex iis quae collegit atque observavit aptas infert conclusiones.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Batteriologia.