

99. Vittorio MAZZARACCHIO. — La sopravvivenza dei fermenti lattici nell'apparato digerente.

Riassunto. — La sopravvivenza dei fermenti lattici nell'apparato digerente viene studiata con un particolare artificio che consente di sottoporre i batteri lattici all'azione diretta dei succhi gastro-enterici ed elimina d'altra parte l'inconveniente che tali germi possono essere scambiati con gli acidogeni abituali dell'intestino.

I due bacilli lattici adoperati, uno del tipo bacillo bulgarico e l'altro del tipo lacto-bacillo acidofilo sono stati uccisi dal succo gastrico soltanto dopo una permanenza nello stomaco di cavia e di coniglio superiore a 60', mentre nell'intestino tenue di cavia vi sono rimasti vivi e vitali almeno per 9 ore.

Résumé. — La survivance des ferments lactiques dans l'appareil digestif est étudié au moyen d'un artifice particulier, qui permet de soumettre les bactéries lactiques à l'action directe des sucs gastro-enterique et qui, d'autre part, élimine l'inconvénient qu'on puisse se méprendre, confondant ces germes avec les acidogènes ordinaires de l'intestin.

Les deux bacilles lactiques utilisés, l'un du type bacillus bulgaricus, l'autre du type lactobacillus acidophilus, n'ont été tués par le suc gastrique qu'après une demeure de plus de 60' dans l'estomac du cobaye et du lapin, tandis que dans l'intestin grêle du cobaye ils sont restés en vie et viables pendant 9 heures au moins.

Summary. — The survival of the lactic ferments in the digestive system has been investigated using a particular artifice which allows, on the one hand, to subject the lactobacilli to the direct action of the gastro-enteric juices, and to remove, on the other hand, the inconvenience of possibly mistaking for such germs the common acidogenous germs of the intestine.

The two lactobacilli employed, the one of the type *Bacillus bulgaricus*, the other of the type *Lactobacillus acidophilus*, were killed by the gastric juice only after remaining for more than 60' in the stomach of the guinea-pig and the rabbit, whereas in the small intestine of the guinea-pig they remained alive and viable at least for 9 hours.

Zusammenfassung. — Die Lebensfähigkeit der Milchfermente im Verdauungsapparat wird mit Hilfe eines besonderem Kunstgriffes studiert, der es ermöglicht die Milchbakterien direkt der Wirkung der gastroenterischen Säfte auszusetzen und andererseits zu verhindern, dass diese Keime mit den stets im Darm vorhandenen Säurekeimen verwechselt werden können.

Die zwei dabei verwendeten Milchbazillen, einer des Typus des bulgarischen Bazillus und der andere des Typus des acidophilen Milchbazillus sind im Magen des Meerschweinchens erst nach 60' langer Einwirkung des Magensaftes getötet worden, während sie im Dünndarm des Meerschweinchens mindestens 9 Stunden lebend und lebensfähig geblieben sind.

Il problema, sempre d'attualità, relativo al meccanismo d'azione dei fermenti lattici ha fra le sue premesse fondamentali quella della sopravvivenza o meno di tali germi nell'apparato digerente.

Ed infatti i sostenitori della concezione biochimica della fermentoterapia lattica hanno le loro argomentazioni sul fatto che alcuni, se non tutti, i fermenti lattici non solo non attecchiscono e non si sviluppano nell'intestino, ma altresì nell'apparato digerente trovano « azioni ostacolanti o distruttive per parte dei succhi gastrici, enterici e della bile » [Puntoni ⁽¹⁾].

Indubbiamente le minuziose ed importanti ricerche del Pergher ⁽²⁾ della scuola di Sanarelli hanno il merito di aver dimostrato che i bacilli lattici vengono uccisi dal succo gastrico. Tale uccisione però avviene, secondo le osservazioni dello stesso Pergher, dopo un'ora e pertanto, poichè la gran massa della cultura lattica passa rapidamente dallo stomaco all'intestino, a detta dello stesso A. « i bacilli lattici attraversano la barriera gastrica, specie se somministrati in gran copia e a stomaco digiuno ».

Nei riguardi del destino dei bacilli lattici pervenuti nell'intestino le ricerche del Pergher hanno dimostrato in maniera abbastanza convincente ch'essi non riescono ad impiantarvi.

(¹) PUNTONI, Moderne concezioni sul meccanismo d'azione dei fermenti lattici, Ann. d'Ig., 49, 533 (1939).

(²) PERGHER, Sul comportamento dei fermenti lattici nell'apparato digerente, Ann., 37, 729 (1927).

E' logico che non potendo fissarsi sulla parete intestinale i bacilli lattici vanno incontro all'eliminazione meccanica con le feci. Potrebbero anche essere distrutti dai succhi enterici e dalla bile, ma la prova di tale distruzione in vivo non può essere data dall'azione che la bile ha mostrato di avere in vitro nelle culture di bacillo bulgaro. Il Pergher ha osservato che la bile nella quantità di cm^3 1 o più per ogni singola provetta di lattocultura impedisce lo sviluppo del bacillo bulgaro, mentre in quantità minori di cm^3 1 si ha lo sviluppo batterico dei lattobacilli rimanendo però impedita la coagulazione del latte.

Quanto sopra spiega come io mi sia convinto dell'utilità di attuare alcune ricerche sperimentali per studiare, se possibile, la sopravvivenza dei fermenti lattici nell'apparato digerente con mezzi diversi da quelli usati dal Pergher.

Ho pensato che bisognava effettuare le ricerche in vivo in condizioni tali che gli abituali acidogeni dell'intestino non abbiano in alcun modo possibilità di associarsi ai fermenti lattici somministrati. Per raggiungere tale scopo mi sono servito del seguente artificio.

Dall'intestino tenue di coniglio ho ottenuto, con una tecnica che preciserò qui di seguito, dei sacchetti sterili i quali, a guisa di salcicciotti, sono stati riempiti sterilmente con culture di fermenti lattici. Tali sacchetti sono stati immessi nello stomaco o nell'intestino tenue di cavie per mezzo della gastrotomia o rispettivamente enterotomia.

Le cavie adulte hanno di solito ben tollerato l'intervento e subito dopo quasi sempre hanno mangiato regolarmente.

Gli animali trattati sono stati uccisi a diverso intervallo di tempo, e, praticata l'estrazione dei sacchetti, è stata eseguita sul contenuto di questi la ricerca batteriologica (culturale e microscopica diretta).

Con questo artificio penso di aver conseguito due vantaggi:

1) aver sottoposto i batteri lattici all'azione dei succhi gastroenterici;

2) aver potuto saggiare lo stato microbiologico dei batteri lattici così trattati, senza incorrere nel dubbio di inquinamento batterico non solo da parte dei diversi germi banali ma anche da parte degli acidogeni abituali dell'intestino.

A questo punto si potrebbe obiettare che sarebbe stato più conveniente usare i sacchetti di collodio invece di quelli di intestino. Rispondo



FIG. 1. — *Bac. bulgaricus* da cultura
in latte (460 ingr.).

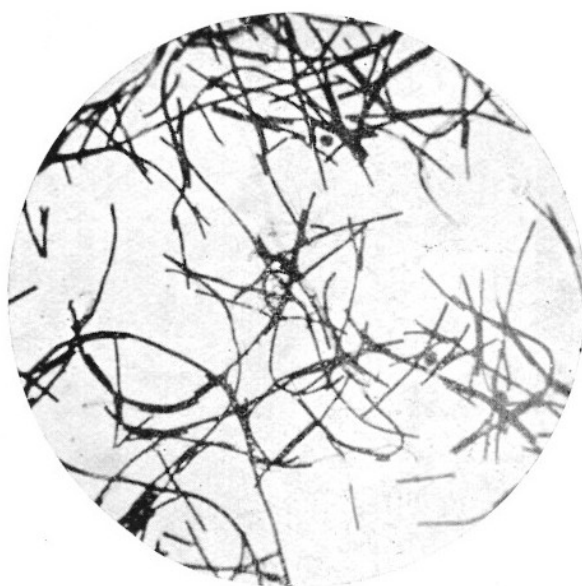


FIG. 2. — *Bac. bulgaricus* da cultura
in brodo lievito di birra (460 ingr.).

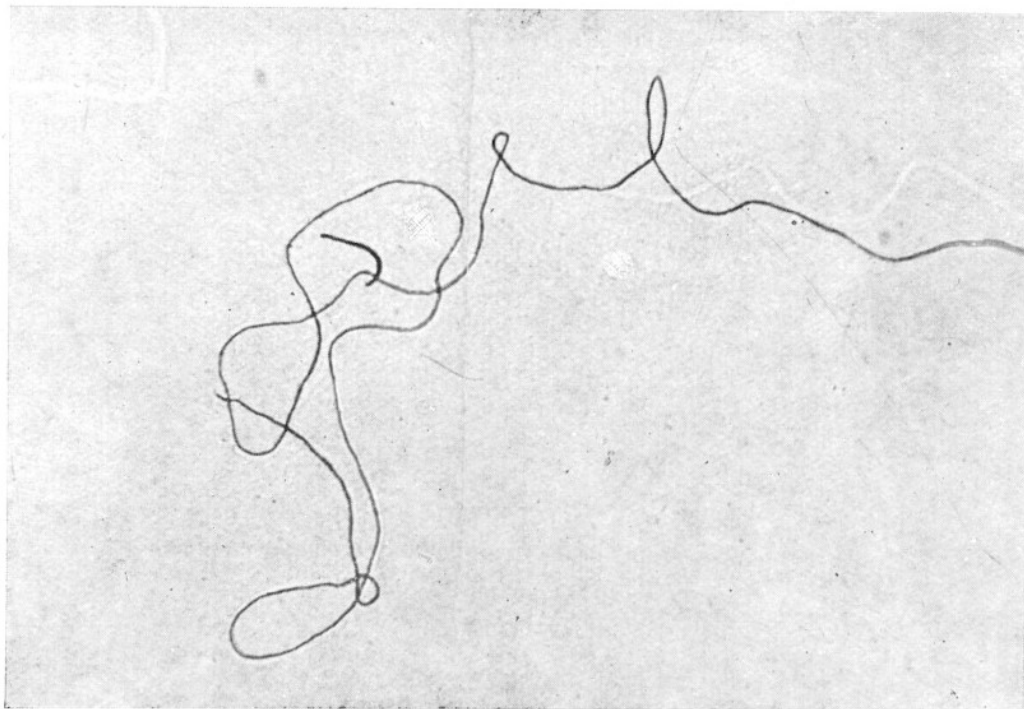


FIG. 3. — *Bac. bulgaricus* da cultura in brodo lievito di birra
(460 ingr.).

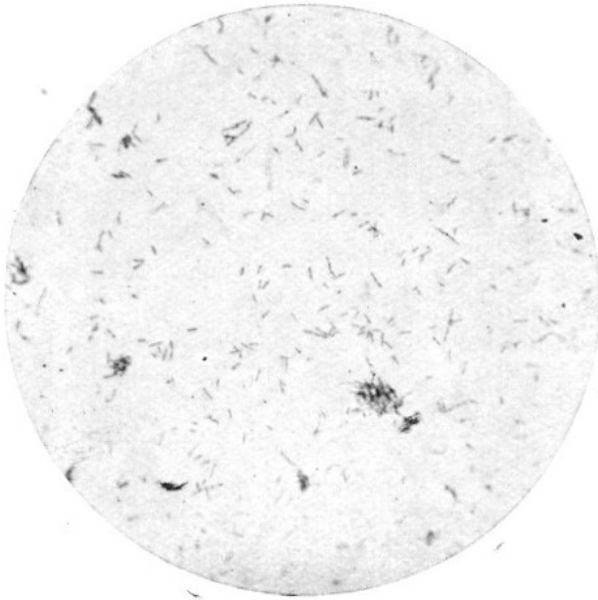


FIG. 4. — *Lattobac. acidofilo* da cultura
in brodo lattosato (460 ingr.).



FIG. 5. — *Lattobac. acidofilo* da cultura
in brodo lievito di birra (460 ingr.).

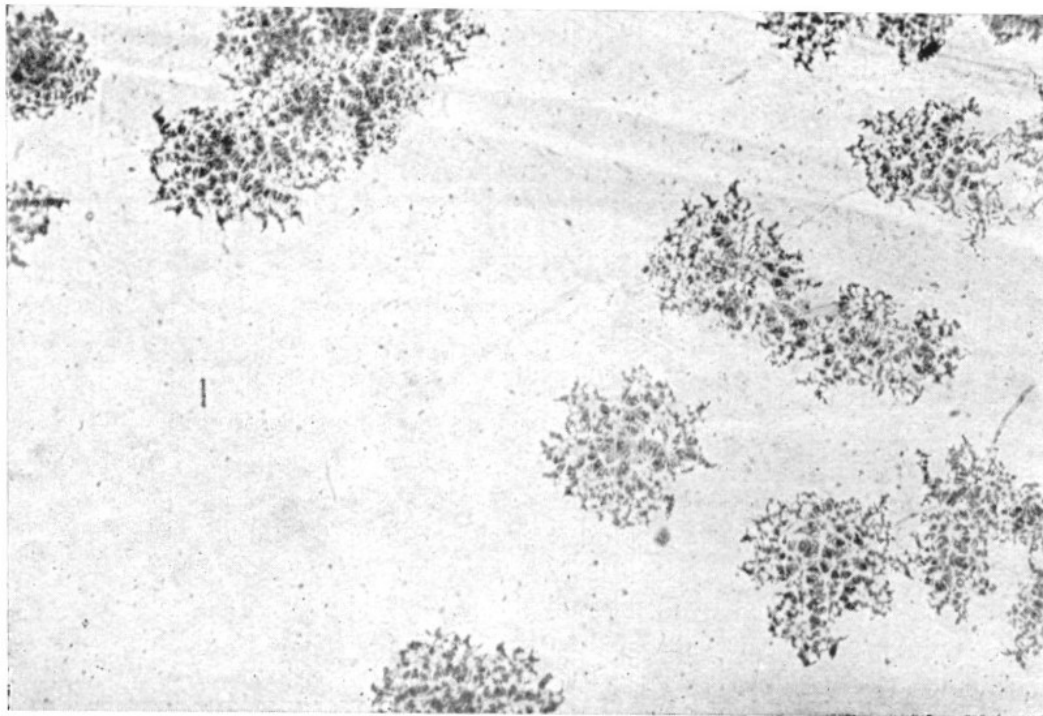


FIG. 6. — Colonie di *Bac. bulgarico* su agar lievito di birra
(10 ingr.).

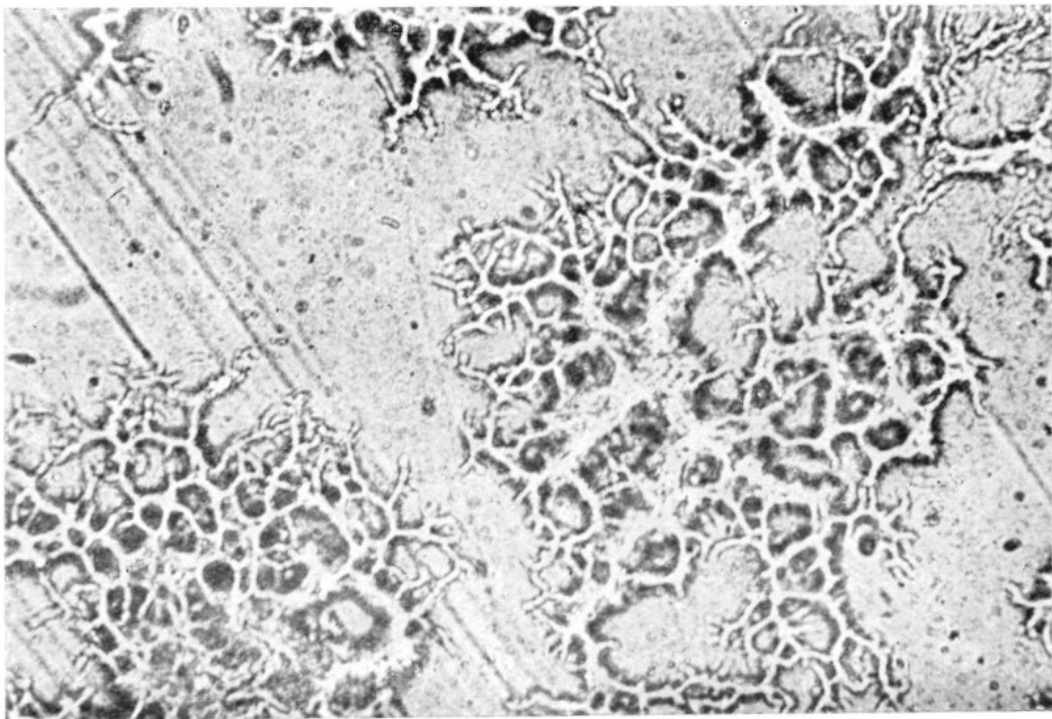


FIG. 7. — Colonie di *Bac. bulgaricus* su agar lievito di birra
(40 ingr.).

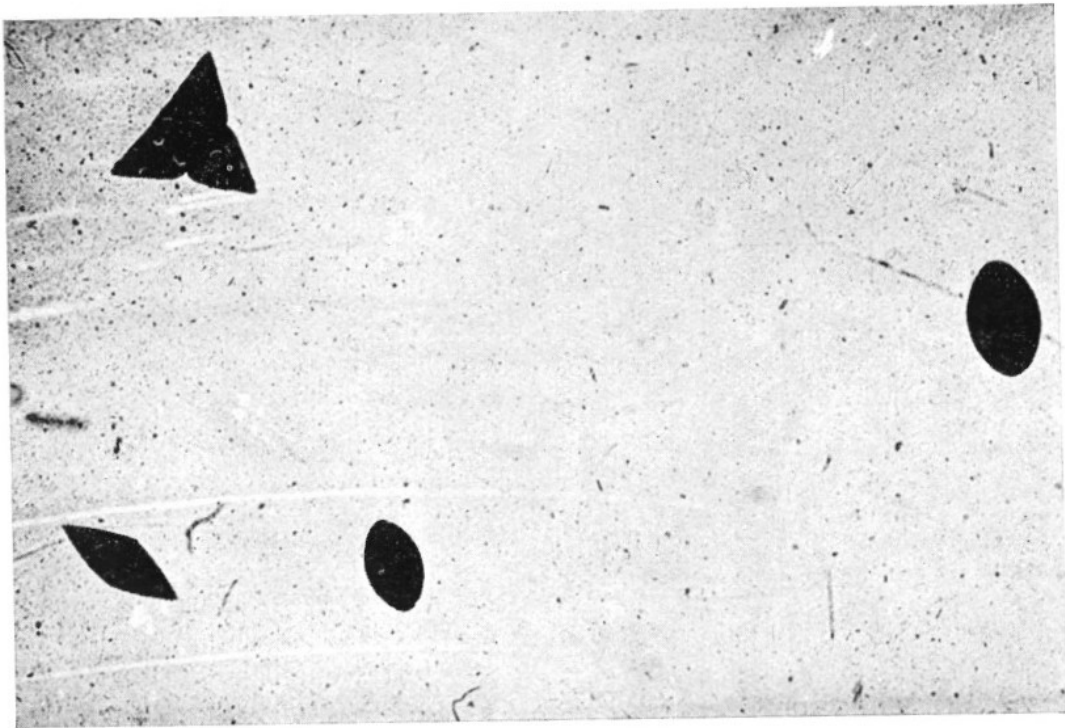


FIG. 8. — Colonie di *Lattobac. acidophilus* su agar lievito di birra
(10 ingr.).

che i sacchetti d'intestino garantiscono la migliore permeabilità verso i succhi gastroenterici e risultano di una maggiore praticità per il loro uso nelle ricerche microbiologiche.

Per le mie esperienze ho usato due ceppi di fermenti lattici uno riportabile al gruppo dei bulgarici e l'altro a quello degli acidofili.

Il ceppo di bacillo bulgarico proviene dalla collezione Lister di Londra e viene da me coltivato da circa 15 anni nel Laboratorio di questo Istituto; l'altro ceppo che chiamerò latto-bacillo acidofilo è stato da me isolato da una fiala di vivi Fides, fermento lattico prodotto dalla Ditta Maggioni di Milano. Desidero precisare che nei riguardi della classificazione dei latto-bacilli seguo i criteri adottati dal Puntoni ⁽³⁾ e distinguo i lattobacilli nelle due specie fondamentali di:

- a) *Lactobacillus bulgaricus*;
- b) *Lactobacillus acidophilus*.

Per evidenziare meglio le differenze morfologiche e culturali fra i due ceppi, li ho coltivati in terreno al latte ed in terreno speciale al lievito di birra di cui indicherò la preparazione.

Nelle figure qui riportate è rilevabile il differente aspetto morfologico e culturale dei due germi, che si evidenzia di più allorchè essi sono coltivati nel terreno speciale al lievito di birra, il quale esalta lo sviluppo batterico di entrambi.

Il bacillo bulgarico in tale terreno tende ad ingrossarsi e ad allungarsi anche in modo che può sembrare inverosimile, il lattobacillo acidofilo non si ingrossa si allunga un poco ed assume una caratteristica formazione a catena.

Il brodo-lievito di birra addizionato con agar-agar dà un terreno solido e trasparente quasi come l'agar semplice, sul quale il bacillo bulgarico cresce in colonie rugose che assomigliano a quelle del carbonchio ematico. Non si tratta però di un vero caput medusae; ma più propriamente di dendrite.

Quantunque il terreno al lievito di birra possa essere considerato un substrato nutritivo d'elezione del bacillo bulgarico, pure la naturale capacità di tale germe a crescere sui terreni solidi si rileva anche in questo.

⁽³⁾ PUNTONI, Sui fermenti lattici adoperati nell'Industria farmaceutica, Ann. d'Ig., 51, 673 (1941).

Ed infatti anche se si è praticato un'abbondante insemminazione il numero delle colonie che si sviluppano non è mai notevole, ma indubbiamente è maggiore di quello che si ottiene su agar al latte.

Su agar-lievito di birra il lattobacillo acidofilo dà colonie di forma rotonda o lenticolare, di aspetto liscio e di grandezza quasi doppia di quelle che si sviluppano nelle culture di agar lattosato.

Preparazione del terreno al lievito di birra. — Il lievito di birra secco del commercio nella proporzione del 3% viene bollito dolcemente in acqua per un'ora e poi messo in ghiacciaia a sedimentare per 24 ore. Si decanta, si aggiunge peptone al 0,5%, lattosio all'1% e si porta a pH 7,2. Si filtra e si sterilizza a vapore fluente per mezz'ora e per tre giorni di seguito. Occorrendo l'agar a tale brodo si aggiunge l'agar-agar al 2%. Al momento dell'uso ad ogni singola provetta o provettone si aggiungono cm³ 1-2 di siero di latte ottenuto dalla fermentazione enzimatica di latte (serve allo scopo oltre la chimosina anche la pepsina) e successiva filtrazione per carta prima e per filtro Seitz dopo.

TECNICA DELLE ESPERIENZE

a) Allestimento dei sacchetti. Conigli in ottime condizioni di nutrizione, dopo essere stati tenuti a digiuno per 12 ore, vengono sacrificati. Si asporta l'intestino tenue e dopo averlo a lungo lavato in acqua corrente lo si taglia in tanti pezzi della lunghezza di circa cm 8. Tali budelli vengono messi in scatole di Petri sterili, versandovi soluzione fisiologica sterile formolata al 0,5%. Dopo averli così tenuti a temperatura ambiente di laboratorio per 24 ore e in frigorifero a +5° per altre 48 ore, i budelli vengono lavati rapidamente in soluzione fisiologica sterile e poi a mezzo pinze, filo di seta e forbici trasformati in sacchetti legando prima un'estremità e poi, dopo il loro riempimento anche l'altra.

Il riempimento viene eseguito con una siringa di vetro sterile innestata ad un ago a lume largo.

In esperienze preliminari ho accertato che in sacchetti così preparati ~~non~~ sterili. Comunque per ogni singola preparazione due sacchetti venivano subito controllati batteriologicamente per accertarne la loro sterilità.

Le culture dei lattobacilli usate nel riempimento dei sacchetti erano ottenute in terreno al latte ed avevano 24 ore di sviluppo.

b) Introduzione dei sacchetti nello stomaco o nell'intestino. I sacchetti allestiti come innanzi venivano introdotti nello stomaco e nell'intestino di cavia adulta del peso di oltre 600 g, sottoposte per la bisogna rispettivamente a gastrotomia ed enterotomia. Per un primo gruppo di ricerche ho usato oltre le cavie anche i conigli.

L'incisione dello stomaco viene praticata nel mezzo della grande curvatura.

L'enterotomia viene eseguita nel digiuno e il sacchetto introdotto viene spinto a monte dell'incisione, in modo che viene a trovarsi a contatto della mucosa integra. Inoltre si ottiene così che la sutura dell'intestino determinando in quel punto un parziale restringimento del lume intestinale contribuisce ad impedire lo spostamento a valle del sacchetto.

Il lume intestinale in corrispondenza della sutura si restringe ma non si chiude completamente.

Nella gran parte degli animali trattati il trauma operatorio è ben tollerato ed essi riprendono presto a mangiare.

I sacchetti introdotti nell'intestino tenue sono stati sempre ritrovati fino a dopo 9 ore dalla loro immissione. Dopo un tempo maggiore possono anche non reperirsi e spesso si presentano in via di disfacimento a causa dell'azione proteolitica esercitata dai succhi enterici sulle pareti di essi.

Nell'annessa tabella ho riportato i dati più interessanti delle mie esperienze.

Per prima vi si rileva l'azione batteriolitica del succo gastrico sia sul bacillo bulgarico che sul lattobacillo acidofilo, azione che si esplica dopo 60 minuti.

Tale fatto, che è una conferma di quanto aveva già osservato il Pergher può essere interpretato come un collaudo dell'artificio da me ideato. Ed infatti resta con ciò dimostrato che attraverso le pareti del sacchetto i succhi gastrici possono penetrare nell'interno di essa ed esplicare la loro azione batteriolitica sui bacilli lattici ivi presenti. Per analogia tale permeabilità entrerà in giuoco anche nel caso in cui il sacchetto sarà a contatto con i succhi enterici.

TABELLA DELLE ESPERIENZE

Animali trattati	Fermento lattico somministrato	Sede del trattamento	Durata del trattamento	Vitalità del fermento lattico dopo il trattamento	Variazioni morfologiche del fermento lattico dopo il trattamento
Cavia	Bac. Bulgarico	Stomaco	30'	Vivo	Nessuna
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	45'	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	60'	»	Aleuni bacilli sono rigonfi
	»	»	»	»	»
	»	»	»	Morto	»
	»	»	75'	»	Bacilli rigonfi Gram-positivi
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
Coniglio	»	»	30'	Vivo	Nessuna
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	45'	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	60'	»	Nessun bacillo rigonfi e Gra-posit.
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	75'	Morto	Bacillo rigonfi Gram-positivo
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
Cavia	»	Intestino tenue	Un'ora	Vivo	Nessuna
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	Due ore	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	Tre ore	»	»
	»	»	»	»	»
	»	»	»	»	»

Segue: TABELLA DELLE ESPERIENZE

Animali trattati	Fermento lattico somministrato	Sede del trattamento	Durata del trattamento	Vitalità del fermento lattico dopo il trattamento	Variazioni morfologiche del fermento lattico dopo il trattamento
Cavia	Bac. Bulgarico	Intestino tenue	Tre ore	Vivo	Nessuna
»	»	»	»	»	»
»	»	»	Quattro ore	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	»	Vivo	»
»	»	»	Cinque ore	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	»	Vivo	»
»	»	»	Sei ore	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	»	Vivo	»
»	Lattobacillo acidofilo	Stomaco	30'	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	45'	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	60'	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	75'	Morto	Bacilli rigonfi
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	Un'ora	Vivo	Nessuna
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	Due ore	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	Tre ore	Vivo	»
»	»	»	»	»	»

Segue: TABELLA DELLE ESPERIENZE

Animali trattati	Fermento lattico somministrato	Sede del trattamento	Durata del trattamento	Vitalità del fermento lattico dopo il trattamento	Variazioni morfologiche del fermento lattico dopo il trattamento
Cavia	Lattobacillo acidofilo	Intestino tenue	Tre ore	Vivo	Nessuna
»	»	»	Quattro ore	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	Cinque ore	Culture inquinate	»
»	»	»	»	Vivo	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	Sei ore	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	»	Vivo	»
»	»	»	Sette ore	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	Otto ore	Vivo	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	»	»	»
»	»	»	Nove ore	»	»
»	»	»	»	Culture inquinate	»
»	»	»	»	»	»

I sacchetti contenenti le culture dei bacilli lattici, introdotti per enterotomia nell'intestino tenue e riesaminate anche 9 ore di loro permanenza nell'intestino stesso, hanno mostrato che i bacilli lattici da essi contenuti erano vivi ed attivi e morfologicamente normali.

Poichè il trauma operatorio non ha modificato in modo appariscente le condizioni di funzionalità dell'apparato digerente e dato che a somiglianza di quanto avviene nello stomaco, è da ritenersi certo che i succhi enterici siano penetrati all'interno del sacchetto, si può dedurre che i bacilli lattici, per il tempo di nostra osservazione, sopravvivono nell'intestino degli animali trattati e non vanno incontro a fenomeni di batteriolisi.

Qual'è il valore di queste conclusioni nei riguardi del problema centrale sul meccanismo di azione dei fermenti lattici? A me basta richiamarmi alla premessa innanzi enunciata. I fautori della teoria biochimica a base delle loro argomentazioni pongono il fatto che alcuni fermenti lattici non solo non attecchiscono e non sviluppano nell'intestino ma vi vanno incontro a distruzione da parte dei succhi enterici e della bile. Or bene una volta dimostrato invece che i bacilli lattici possono sopravvivere nell'intestino, l'affermazione che il meccanismo d'azione dei fermenti è « indipendente dal loro stato vitale » non ha più ragione di essere così categorica ed assoluta.

Può darsi invece che accanto:

- 1) all'azione biochimica della vitamina B₂;
- 2) all'azione dell'acidità;
- 3) all'influenza collaterale sulla flora intestinale data dal regime alimentare ricco in glucidi che è il complemento necessario della fermento-terapia;

vi possa essere un'azione diretta dei lattobacilli limitatamente al tempo della loro sopravvivenza e della loro presenza nell'intestino.

Il problema del meccanismo d'azione dei fermenti lattici è così arduo e complesso che la stessa teoria sull'azione biochimica della vitamina B₂ non è che un'ipotesi. E questa ipotesi viene ad essere contrastata dal fatto accertato da Warburg e Cristian ⁽⁴⁾ che i bacilli butirrici, i quali sono

⁽⁴⁾ WARBURG e CHRISTIAN, Sauerstoffuebertragendes Ferment in Milchsäurebazillen, Bioch. Zeitsch., 260, 499 (1933).

sovente dei germi proteolitici attivi, sono ricchi di vitamina B₂ ancor più dei fermenti lattici e conseguentemente potrebbero giovare anch'essi per il loro sviluppo dell'apporto di vitamina B₂ da parte della fermentoterapia lattica.

D'altra parte l'azione terapeutica dei fermenti lattici può forse essere legata ad altri fattori. A tale riguardo è indubbiamente molto suggestiva l'ipotesi che tali fermenti possano contenere batteriofagi ed enzimi.

Comunque siamo sempre nel campo dell'ipotesi e ciò dimostra quanto altro lavoro è riservato agli studiosi che si vorranno interessare dell'argomento. Mi riservo di comunicare i risultati di altre ricerche in corso.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di micrografia. Dic. 1948.
