

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI
ANNO CCXCIX.
1902

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XI.

2° SEMESTRE.



ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1902

Batteriologia. — *Sui bacteri dei dotti galattofori delle vacche* (1). Nota del dott. COSTANTINO GORINI, presentata dal Socio L. CREMONA.

È cosa oramai accertata, per opera specialmente delle ricerche di Ward (2), che nei dotti galattofori delle vacche si contengono dei bacteri, per cui il latte, il quale quando è secreto da ghiandole mammarie sane è sterile, si contamina, ancor prima di uscire dalle mammelle, nell'attraversare i canaletti che lo guidano dalle ghiandole agli sbocchi dei capezzoli. Quei bacteri derivano evidentemente da germi che stanno nei pressi di questi sbocchi e che gradatamente si propagano lungo quei canaletti, trovando nella temperatura del corpo dell'animale una condizione opportuna per moltiplicarsi rapidamente fra una mungitura e l'altra. Questi bacteri naturalmente vengono poi trascinati col latte fuoruscite e segnatamente coi primi zampilli (de Freudenreich) (3).

Ciò posto, sorge la questione di conoscere il grado e la natura di una tale contaminazione evidentemente *inevitabile*, per l'influenza che essa può esercitare sulla conservazione del latte e sulla sua attitudine alla fabbricazione del burro e del formaggio.

Degli sperimentatori che si occuparono fin qui dell'argomento, alcuni [Ward (4), Dinwiddie (5), Bolley (6), Burr (7)] vennero alla conclusione che la flora microbica dei dotti galattofori debbasi considerare pressochè indifferente per le alterazioni del latte; altri [Moore (8), Esten (9)] vi constatarono

(1) Queste ricerche furono eseguite in parte nel Laboratorio di batteriologia dell'Istituto Federale Agrario di Berna (Svizzera), in parte nel Laboratorio di batteriologia della R. Scuola Superiore di Agricoltura di Milano.

(2) Archibald R. Ward, *The persistence of bacteria in the milk ducts of the cow's udder* (Journal of applied microscopy, v. I, n. 12). — *The invasion of the udder by bacteria* (Bulletin 178 of the Cornell University Agricultural Experiment Station. January 1900).

(3) Ed. de Freudenreich, *Die Bakteriologie in der Milchwirthschaft*, Jena, 2ª ediz., *passim*.

(4) Archibald R. Ward, *The persistence of bacteria in the milk ducts of the cow's udder* (Journal of applied microscopy, v. I, n. 12). — *The invasion of the udder by bacteria* (Bulletin 178 of the Cornell University Agricultural Experiment Station. January 1900).

(5) R. R. Dinwiddie, *Arkansas Agricultural Experiment Station*. Bulletin n. 45, p. 56.

(6) H. L. Bolley und Hall, *Ueber die Konstanz von Bacterienarten in normaler Rohmilch* (Centralblatt f. Bakteriologie etc. II Abt., p. 1895, Band I, p. 788 e 795).

(7) Rollin H. Burr, *The source of the acid organisms of milk and cream* (Centralblatt f. Bakteriologie II Abt. p. 1902, Band VIII, p. 236).

(8) V. A. Moore, *Preliminary Investigations concerning the number and nature of bacteria in freshly drawn milk* (12° and 13° Annual Report of the Bureau of animal industry, U. S. Dep't of Agr. p. 261).

(9) W. M. Esten, *Bacillus acidi lactici and other acid organisms found in American dairies* (9° Annual Report of the Storrs Agricultural Experiment Station, p. 49).

invece dei veri fermenti lattici capaci di acidificare rapidamente il latte e quindi di grande importanza per la lavorazione del latte.

Durante la mia dimora presso il laboratorio di batteriologia della stazione federale agraria di Berna nell'autunno del 1901, l'egregio direttore di quell'Istituto dott. de Freudenreich (a cui porgo i più sentiti ringraziamenti) mi propose di esaminare la flora microbica dei dotti galattofori delle mungane della vaccheria annessa alla stazione stessa. Io accettai volentieri l'incarico e stimai anzi opportuno di estendere le ricerche anche ad altre due stalle situate in vicinanza dell'Istituto, per vedere se le diverse condizioni di ambiente, di pulizia ecc. avessero influenza sulla suddetta flora.

Le vacche esaminate furono in tutto 22, di cui 14 appartenenti all'Istituto, 6 ad una stalla esterna e 2 ad un'altra stalla esterna.

Di 14 vacche (10 dell'Istituto e 2 di ciascuna vaccheria esterna) analizzai separatamente il latte di ciascun capezzolo per rilevare le eventuali differenze nel contenuto microbico dei diversi capezzoli di ciascuna mammella; delle altre 8 vacche analizzai il latte misto di due capezzoli appartenenti alle due diverse metà della mammella.

Per avere un'idea il più possibilmente completa sui batteri capaci di vegetare entro i dotti galattofori, stimai necessario raccogliere nel modo più asettico possibile le *primissime* stille di latte di ciascuna mungitura.

A tal uopo dovetti rinunciare a qualunque ripulitura delle mammelle e dei capezzoli, perchè osservai che, se la si faceva ammodo, durante le operazioni di lavatura e di asciugatura fuorusciva sempre qualche po' di latte, per la qual cosa veniva a fallire lo scopo di sottoporre ad esame il primo latte contenuto nei dotti galattofori. Laonde, dopo alcuni tentativi, adottai il metodo seguente che possiamo chiamare di *spremitura a secco*.

Prima dell'ordinaria mungitura, e cioè prima che si masturbassero e si inumidissero, come di solito, i capezzoli, facevo esercitare dal mungivacche, a mani pulite e asciutte, una leggiera compressione sulla base del capezzolo, in modo da evitare qualunque sfregamento e qualunque contatto colle adiacenze dello sbocco del capezzolo, e da spremere fuori rapidamente e in un sol getto qualche centimetro cubico di latte, che veniva subito raccolto in una provetta sterilizzata munita del suo tappo di ovatta. I campioni venivano, entro 5-10 minuti al più, sottoposti a cultura in laboratorio.

Con ogni campione allestii quattro culture a piatto, e cioè: due piatte in gelatina semplice, di cui una con una goccia di latte e una con due gocce d'una diluzione di latte (una goccia di latte in 5 cc. di acqua potabile sterilizzata); e due piatte in gelatina al siero di latte allestite come le precedenti.

Le culture erano tenute in osservazione a circa 20° C. per 8 giorni almeno; bene spesso per 15 e talora fino a 21 giorni, quanto era necessario per accertare vuoi che lo sviluppo di nuove colonie era completamente cessato, vuoi che certe colonie erano assolutamente non fondenti ecc.

Riserbandomi di riferire altrove circa le singole esperienze, ecco per ora in riassunto i principali risultati.

A. Risultati.

1. Nessuna delle 14 mammelle di cui furono esaminati isolatamente tutti e quattro i capezzoli fu riscontrata completamente amicrobica; solamente due capezzoli appartenenti a due diverse mammelle risultarono sterili alle culture.

Una sola delle 8 mammelle, di cui furono esaminati complessivamente due soli capezzoli, risultò amicrobica.

2. Il contenuto microbico di ciascun capezzolo variò da un *minimum* di 20 colonie ad un *maximum* di 300 mila colonie batteriche per centimetro cubico di latte.

È da notare però che questo *maximum* fu riscontrato fra le vacche appartenenti alle stalle esterne che erano governate con deficiente pulizia (v. più sotto al n. 8); invece il contenuto dei dotti galattofori delle 14 vacche dell'Istituto non superò la cifra di 85 mila colonie batteriche per centimetro cubico di latte.

3. In generale osservai una sensibile affinità, se non un'assoluta identità, nel contenuto microbico dei quattro capezzoli di una medesima mammella; in alcuni casi però taluno dei capezzoli dimostrò di contenere una flora particolare, cioè decisamente diversa per quantità (due casi) od anche per qualità (cinque casi) da quella degli altri capezzoli della medesima mammella.

4. Eccettuate sei vacche sulle quali ritornerò in seguito (v. n. 8), in tutte le altre sedici vacche esaminate la flora microbica dei dotti galattofori risultò costituita prevalentemente, e spesso anche esclusivamente, da una sorta di cocchi morfologicamente simili fra loro, così per la forma individuale, come per la forma delle colonie nelle piatte di gelatina. Sono cocchi di media grossezza (intorno a 1μ di diametro), talora alquanto ovali, aggruppati talora a grappolo, ma il più spesso a quattro o a due, assumendo soventi volte la figura di un chicco da caffè.

Nelle piatte di gelatina essi danno delle colonie rotonde, a contorni regolari, piuttosto piccole, di colore giallognolo più o meno intenso, sia profonde che superficiali (anaerobiosi facoltativa). Fisiologicamente invece questi cocchi presentano delle differenze, per cui se ne possono distinguere diversi tipi.

5. Lo studio particolareggiato istituito sopra 127 colonie isolate dai dotti galattofori di dieci vacche e seminate in cultura pura nei varî mezzi nutritivi, mi ha permesso di stabilire cinque *tipi principali* di tali cocchi, distinguendoli fra loro specialmente in base al comportamento in gelatina lattosata (al 4 %) e in latte.

Li designo col nome di « tipi » per non entrare qui nella questione se si tratti di altrettante specie o di semplici varietà. Ciò che posso dire fin da ora si è che i caratteri di ciascun tipo si mantennero costanti in tutte le prove che nel corso di un anno sono andato facendo e ripetendo, dapprima nel laboratorio di Berna e in seguito nel laboratorio di batteriologia della R. Scuola superiore di agricoltura di Milano.

Quei tipi sono:

TIPO UNO. *Cocco pseudofondente; coagulante.* — Lo designo « pseudofondente », perchè esso infossa lentamente la gelatina lattosata, senza fonderla; cosicchè nelle culture a piatto le sue colonie, dopo qualche giorno di sviluppo, appaiono circondate da una zona scodelliforme di gelatina di cui esse occupano il fondo depresso. Toccando con l'ago di platino è facile persuadersi che la gelatina contenuta nella scodella non è liquefatta, e nemmeno rammollita, di guisa che la piatta, ancora dopo quindici giorni, conserva la propria consistenza e integrità e, osservata a luce radente, appare come faccettata.

Coagula il latte in 2-4 giorni a 37° C., con reazione acida, con espulsione di poco siero limpido, quasi incolore, senza peptonificazione successiva.

In brodo lattosato a 37° sviluppassi discretamente in 24 ore, acidificandolo.

TIPO DUE. *Cocco a rapida e sproporzionata fusione limpida; coagulante.* — Nelle piatte in gelatina lattosata questo tipo forma delle colonie pressochè puntiformi (assai più piccole di quelle degli altri tipi), le quali si circondano rapidamente (talora ancor prima che la colonia si sia resa visibile) di un ampio alone di gelatina fusa *limpida*, cioè non invasa dalla parte sostanziale della colonia. Ne deriva una sproporzione fra le dimensioni della colonia e quelle della zona di fusione, che in progresso di tempo va accentuandosi, poichè mentre questa si allarga di molto, la colonia ingrossa di poco e anzichè espandersi nella scodella di liquefazione, cade in massa sul fondo di essa.

Coagula il latte in 24-48 ore a 37°, con reazione acida, con espulsione di abbondante siero limpido, giallognolo, e con successiva lenta peptonificazione, la quale però non è mai completa e lascia sempre una porzione di coagulo indigesto.

In brodo lattosato a 37° si sviluppa rigogliosamente in 24 ore, acidificandolo leggermente.

TIPO TRE. *Cocco a fusione torbida; coagulante.* — Le colonie sulle piatte in gelatina lattosata fondono piuttosto lentamente, intorbidando il liquido di fusione al pari dei più comuni batteri liquefacenti. È però da ricordare che talora qualche colonia tarda a fondere e ad espandersi nel liquido di fusione, così da assomigliare per qualche tempo, ad es. fino all'ottavo giorno, ad altri tipi, e segnatamente a quelli non fondenti o al tipo pseudofondente.

Coagula il latte in 4-5 giorni a 37° C., con reazione anfotera prevalentemente acida, e con successiva rapida peptonificazione, che trasforma completamente il coagulo in un liquido giallastro.

In brodo lattosato a 37° si sviluppa in 24-48 ore, ma non troppo rigogliosamente.

TIPO QUATTRO. *Cocco non fondente; coagulante.* — Le colonie sulle piatte in gelatina lattosata sono dapprima tutte eguali, ma dopo alcuni giorni assumono due aspetti diversi a seconda che sono profonde o superficiali; le profonde conservano il colore gialletto originario, le superficiali invece vanno lentamente sollevandosi sulla superficie della gelatina lattosata, così da sembrare piccole capocchiette di spillo e assumono una tinta bianchiccia. Non fondono la gelatina neppure dopo ventun giorni.

Coagula il latte a 37° con reazione acida, ma molto tardivamente, cioè verso il 15° giorno, e talora soltanto al 30° giorno; quasi nessuna espulsione di siero; nessuna peptonificazione.

In brodo lattosato a 37° si sviluppa abbondantemente in 24 ore, acidificandolo.

TIPO CINQUE. *Cocco non fondente; non coagulante.* Nelle culture a piatto è simile in tutto al tipo quattro.

In latte non coagula a 37° neppure dopo 53 giorni, e non ne altera la reazione anfotera primitiva, cosicchè il latte non coagula neppure coll'ebollizione.

In brodo lattosato a 37° si sviluppa in 24-48 ore, ma non troppo rigogliosamente e senza acidificarlo.

6. Circa la distribuzione di questi diversi tipi di cocchi nei singoli capezzoli, non ritengo possibile acquistare un criterio esatto in base alla semplice osservazione delle culture a piatto allestite coi campioni di latte. Imperocchè io ho potuto verificare che, soprattutto quando in queste piatte si sviluppava un numero rilevante di colonie, i caratteri dei singoli tipi erano bene spesso falsati, verosimilmente in causa dei disturbi reciproci derivanti alle manifestazioni vitali delle colonie dall'accumulo dei rispettivi prodotti di ricambio. Così è che più di una volta una colonia, che sulle piatte originarie sembrava non fondente, trasportata in cultura pura si palesò per pseudofondente o del tutto fondente; più frequenti poi occorsero gli scambi fra i primi tre tipi di colonie. Tant'è che per la differenziazione dei sopra descritti cinque tipi di cocchi, credetti necessario allestire delle piatte con culture pure di ciascun tipo e in modo che ciascuna piatta contenesse un piccolo numero di colonie. Aggiungasi poi che per la distinzione dei due tipi non fondenti (tipi quattro e cinque) è indispensabile il trapianto in latte.

Da quanto precede si capisce di leggieri che, ove io avessi voluto conoscere con precisione quali tipi si contenessero nei dotti galattofori di ciascun capezzolo, avrei dovuto isolare e studiare separatamente ciascuna delle colonie

sviluppatasi nelle piatte. Questo io feci solamente in qualche caso in cui il numero delle colonie sviluppatesi era esiguo, come accadde frequentemente nelle piatte allestite con latte diluito. Ma nella maggior parte dei casi mi limitai a trasportare in cultura pura quelle colonie che *apparivano* differenti sulle piatte originarie.

Pertanto, rinunciando ad emettere un giudizio sulla maggiore o minor diffusione di un tipo piuttosto che dell'altro, in base alle mie osservazioni mi credo autorizzato a dichiarare soltanto: 1°, che i tipi non fondenti apparvero più diffusi (non direi più numerosi) dei tipi fondenti la gelatina lattosata, per il fatto che furono trovati anche in alcuni capezzoli poveri di bacteri, dove non incontrai invece rappresentanti dei tipi fondenti; 2°, che sebbene nella maggior parte dei casi io abbia constatato rappresentanti di diversi tipi insieme mescolati, tuttavia ho l'impressione che nei singoli capezzoli e talora in tutti i capezzoli di una data mammella, uno dei tipi fosse in grande prevalenza sugli altri.

7. Accanto ai succitati tipi predominanti di cocchi, ho incontrato qua e là, solamente in taluno dei capezzoli e sempre in numero piuttosto esiguo, altre tre qualità di cocchi caratterizzati dalla proprietà di rendere alcalino il latte senza coagularlo nè alterarne le qualità esteriori, tutt'al più facendolo debolmente e lentamente ingiallire. Questi cocchi, di cui uno fonde e due non fondono la gelatina lattosata, formano sulle piatte delle colonie che si distinguono facilmente sia fra loro, sia da quelle dei tipi precedenti, laonde essi meritano di essere considerati senz'altro come specie a sè.

8. Solamente in 6 vacche ho trovato che la flora microbica dei dotti galattofori (eccettuato in qualche capezzolo) era rappresentata prevalentemente, e in una vacca anzi esclusivamente, da altre qualità di germi, e precisamente da uno streptococco non liquefacente che nelle piatte di gelatina forma coloniette minutissime, profonde (anaerobiosi), e che coagula il latte in 24-48 a 37° C. con reazione acida, quasi senza espulsione di siero e senza peptonificazione; insomma ha tutti i caratteri dei comuni *fermenti lattici*.

Questo bacterio si conteneva in quantità rilevantissima nei campioni di latte, raggiungendo la cifra di 300 mila colonie per centimetro cubico di latte, mentre il numero delle colonie dei soliti tipi di cocchi era piuttosto esiguo, e in un caso anzi era nullo. E d'uopo peraltro riconoscere che la copia di colonie di streptococchi era tale da riuscire di ostacolo allo sviluppo di colonie di altri germi sulle medesime piatte, quand'anche questi vi fossero stati presenti.

Ad ogni modo è degno di nota il fatto che le 6 vacche nelle quali fu trovato questo streptococco appartenevano tutte alle due stalle esterne, mentre esso mancava completamente nelle vacche appartenenti all'Istituto, che erano governate con maggior pulizia di quelle. Nelle altre due vacche delle stalle esterne si constatarono solamente colonie dei soliti tipi di cocchi.

B. Deduzioni.

I. Considerando:

a) che in tutte le vacche esaminate (eccetto una sola) si trovarono i succitati tipi di cocchi, i quali poi in 16 vacche su 22 rappresentavano la flora microbica predominante e spesso anche esclusiva dei dotti galattofori;

b) che le sei vacche nelle quali quei tipi di cocchi si mostrarono parzialmente o totalmente soppiantati dallo streptococco lattico, appartenevano a stalle tenute con deficiente pulizia;

parmi che dalle mie ricerche si possa dedurre che *la flora normale dei dotti galattofori delle vacche sia costituita essenzialmente dai sovradescritti tipi di cocchi*, fra i quali, sebbene non si trovino rappresentanti dei comuni fermenti lattici, ne esistono tuttavia alcuni (v. il tipo uno e ancor più il tipo due) capaci di alterare il latte colla medesima rapidità dei fermenti lattici propriamente detti.

Vero è che questi tipi rapidamente coagulanti non sono stati riscontrati in tutte le vacche esaminate; ma è vero altresì che in alcuni capezzoli essi si contenevano in quantità molto rilevanti; per cui fa d'uopo ritenere che la flora batterica normale dei dotti galattofori delle vacche non sia senza importanza per la lavorazione del latte; se e in quali casi essa possa riuscire di danno o di vantaggio per l'industria casearia, non è argomento di cui mi voglia occupare qui; vi ho già accennato in un precedente lavoro a proposito dei batteri acido-presamigeni contenuti nei dotti galattofori (1), e intendo ritornarvi in altra occasione.

II. — I risultati delle mie esperienze danno anche modo di spiegare le opposte conclusioni a cui vennero i precedenti ricercatori.

Infatti: a) se pensiamo alla grande somiglianza ed ai facili scambi che ho fatto notare fra le colonie dei diversi tipi di cocchi sulle piatte di gelatina, non fa meraviglia che ad alcuni osservatori siano sfuggiti per l'appunto i tipi rapidamente alteranti il latte, per cui essi hanno potuto concludere « che la flora microbica dei dotti galattofori non è tale da alterare profondamente il latte ».

b) d'altra parte se si considera che in alcune vacche ho constatato in grande abbondanza uno streptococco avente tutti i caratteri dei comuni fermenti lattici, non fa meraviglia che altri osservatori abbiano potuto trovare nei dotti galattofori il *Bacillus acidi lactici*, prototipo dei fermenti lattici; che anzi quella constatazione lascia altresì adito alla possibilità che in casi eccezionali (poca pulizia, malattie pregresse ecc.), attecchiscano in quei dotti anche altri batteri capaci di produrre profonde alterazioni nel latte, pur essendo inoffensivi per le vacche.

(1) Gorini C., *Sui batteri acido-presamigeni del latte* (Rendiconti del Reale Istituto lombardo di scienze e lettere, dicembre 1901).