

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCII.

1905

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVICCI

1905

da un certo valore m'' dell'indice n in avanti. Sia m_2 il più grande dei numeri m' ed m'' ; per $n > m_2$ le (1) e (2) saranno verificate rispettivamente nei punti di γ_i e di γ_o . Ripetendo il ragionamento fatto alla fine del § 1 (Oss. II), si riconosce che esiste una ed una sola curva chiusa $\gamma_o^{(n)}$, ($n > m_2$), appartenente alla $C_p^{(n)}$, contenuta in F e che contiene, alla sua volta, la curva γ_i . Ciò premesso, si supponga che nella curva γ_o vi sieno q zeri di $f(x)$. Pel corollario del § 2, essa contiene q zeri di $f_n(x)$, da un certo valore m_3 dell'indice n in poi. Indicando con m il più grande dei numeri m_1, m_2, m_3 , per $n > m$ sono verificate tutte le condizioni precedenti; e quindi la curva $\gamma_o^{(n)}$ contiene tutti gli zeri di $f_n(x)$, in numero di q , che sono interni alla γ_o e questi soltanto. Essa contiene in conseguenza $q - 1$ zeri della $f'_n(x)^{(1)}$, i quali, per le considerazioni precedenti, sono alla loro volta contenuti in γ_o . Tenendo presente che per l'ipotesi fatta lungo questa curva la $f'(x)$ non si annulla, si può concludere (§ 2) che essa contiene $q - 1$ zeri, e soltanto $q - 1$, di $f'(x)$, ciò che dimostra l'asserto.

Zoologia. — *Della degenerazione senile nei Protozoi* ⁽²⁾. Nota di PAOLO ENRIQUES, presentata dal Socio C. EMERY.

Faccio seguito, colla presente Nota, ad una comunicazione che feci due anni fa al Congresso zoologico di Rimini ⁽³⁾. Mostrai allora come Infusori allevati in piccole culture siano sensibili più che ad altre condizioni, alle influenze batteriche; e come queste determinino in loro fenomeni degenerativi; gli AA. che, come il Maupas ⁽⁴⁾, hanno constatato simili fenomeni nelle culture di Infusori ai quali sia impedita la coniugazione, hanno essi evitato le intossicazioni batteriche, in tal maniera da poter affermare che le degenerazioni osservate siano da attribuirsi non a queste, ma a proprietà insite negli organismi stessi della esperienza? Ciò non essendo stato fatto, si possono attribuire ai batteri le influenze nocive, e sospettare inesistente la degenerazione detta senile.

A questo punto arrivai colle ricerche, i cui risultati vennero esposti nella comunicazione succitata. Avendo continuato a farne numerose e prolungate molto, ne riferisco qui brevemente i risultati principali, che completano quelli precedenti; ho voluto avere di fronte alla impossibilità di mantenere senza degenerazioni in vita Infusori sotto l'influenza di troppi batteri, la prova po-

⁽¹⁾ C. A. Dell'Agnola, loc. cit.

⁽²⁾ Le ricerche di cui si tratta in questa Nota e nella seguente di ugual titolo, sono state compiute nell'Istituto zoologico dell'Università di Bologna.

⁽³⁾ *Monitore zool. Ital.*, v. 14, pagg. 349-351, 1903.

⁽⁴⁾ *Recherches expérimentales sur la multiplication des Infusoires ciliés*. Arch. zool. expér. (2) T. 6, pagg. 165-277, 1888.

sitiva della mia affermazione; ossia, dimostrare la possibilità di evitare la degenerazione, evitando l'eccessivo sviluppo di batteri.

Metodi di ricerca. I metodi, semplicissimi, facilissimi ad essere seguiti per una settimana, offrono grandi difficoltà per la durata delle esperienze che deve essere molto lunga. Bisogna avere la pazienza di non derogare mai da certe regole, neppure per un giorno; ciò che, di fronte alla monotonia delle operazioni manuali da fare tutti i giorni, costituisce una lotta incessante colla irrequietezza sempre crescente del proprio spirito. Non bisogna trascurare questo elemento psicologico nelle ricerche di cui si tratta, perchè ho acquistato la convinzione che nella degenerazione senile degli Infusori, di *vecchio* non c'è altro che la pazienza dello sperimentatore.

Come altri hanno fatto, ho seguito le generazioni di Infusori, partendo da un solo individuo di ciascuna specie. Questo, isolato in una piccola cultura, si trova, il giorno seguente, sostituito da due o più discendenti; di questi se ne isola uno, o diversi in culture separate; e così ogni giorno o più volte al giorno nella stagione calda, tenendo nota del numero di generazioni che si seguono per divisione. Innanzi tutto dò le regole a cui mi sono attenuto scrupolosamente nel fare queste culture.

Le specie che ho coltivato, *Glancoma scintillans*, *Stylonicchia pustulata*, *Vorticella nebulifera*, si prestano bene ad essere alimentate con infusi di fieno, contenenti batteri e flagellati. Faccio sempre gli infusi rapidamente, mettendo a bollire per pochi minuti una piccola quantità di fieno in acqua potabile; dopo la bollitura, il liquido ancor caldo lo verso in una vaschetta di vetro a coperchio, prima sterilizzata, perchè non contenga Infusori. Ho due o tre di queste vasette sempre in funzione; quando un infuso lo giudico vecchio e cattivo, vuoto la vaschetta, che non ha bisogno di essere sterilizzata, perchè non contiene Infusori; e vi verso un infuso nuovo. Così batteri e flagellati si sviluppano rapidamente in questo nuovo infuso, non essendo stati tutti distrutti, quelli che erano aderenti alle pareti della vaschetta. Non mi è mai accaduto di trovare in questi infusi degli Infusori, se non ce li avevo messi consapevolmente. Il fieno adoperato, non troppo giallo, dà infusi di un colore intermedio tra il verdolino e l'arancione; col tempo il colore si intensifica, passando al rossiccio. Mutato il colore, va mutato l'infuso.

I Protozoi sperimentati vivono in gocce scoperte, appoggiate su vetrini. Per comodità ho preparato dei piccoli vetrini coprioggetti, o dei pezzetti di lastra di vetro un po' più grossa, ma tagliata in piccole dimensioni (quadrati o rettangoli aventi da 1 a tre cm. di lato), ai quali ho saldato tutto attorno un pezzo di fine bacchetta di vetro, piegata ad avere la forma del contorno del vetrino, e saldata a fuoco in un vertice. La bacchetta è unita al vetro mediante ceralacca; in questi piccoli recipienti una goccia di liquido rimane abbastanza difesa dai possibili incidenti, e si può anche osservare a forte ingrandimento, capovolgendo il ve-

trino, quando esso è sottile. È importante però che la ceralacca non sia lasciata a fare da limite esterno alla goccia; altrimenti l'acqua facilmente sale su di essa, magari abbandonando la parte di mezzo del vetrino. Per evitare questo, basta porre dei piccolissimi pezzetti di paraffina sopra alla ceralacca della saldatura e farli fondere con un ferretto scaldato; la goccia deve rimanere, si capisce, sul vetro pulito, ma se anche viene in contatto colla paraffina, non vi sale sopra.

Partendo p. es. da un Glaucoma, che vive in una di queste gocce, quando esso si è diviso, distribuisco i due discendenti su due vetrini consimili, per mezzo di una pipetta, come si usa fare, seguendo il Maupas. Cerco di trasportare pochissimo liquido della goccia originaria; aggiungo parecchia acqua potabile (è un pregiudizio che sia necessario usare acqua piovana) ed una piccola quantità dell'infuso alimentare, ricco di batteri e flagellati. In questo modo si evita l'azione dei prodotti di eliminazione degli Infusori in esperienza, giacchè quella piccola quantità che si trasporta coll'individuo che viene isolato, si diluisce in una quantità di liquido molto maggiore; si evita l'azione delle tossine batteriche in eccessiva quantità, perchè dell'infuso alimentare si prende una quantità molto piccola, che viene diluita in molt'acqua; si dà invece da mangiare abbondantemente agli Infusori, giacchè la gocciolina di infuso è ricca di batteri e flagellati; nè vi è il tempo che questi infettino l'ambiente in maniera pernicioso, giacchè ogni giorno ed anche più spesso tutto viene rinnovato. In fondo, questa maniera di formare le gocce riesce vantaggiosa per un fatto che l'esperienza ha dimostrato vero: porre un Infusorio in una goccia di un infuso grande 1 mm. c. e contenente 10,000 batteri, non è lo stesso che porlo in una goccia di 0,1 mm. c. contenente ugualmente 10,000 batteri, e diluito al momento con acqua pura fino ad 1 mm. c. Nel primo caso i pericoli di morte per l'Infusorio sono enormemente maggiori. È inutile che io stia a discutere ampiamente quali possono essere le ragioni di questa differenza, delle quali molte se ne intravedono facilmente; qui si tratta soltanto di trovare un metodo che *in pratica* assicuri maggiori probabilità di vita agli Infusori; e quello sopra indicato corrisponde bene.

Ho sempre rifuggito da culture fatte in vetro portaoggetti coperto da coprioggetto, sia pure con qualche cosa interposta per conservare i due vetri ad una certa distanza. Questo metodo, che ho provato ripetutamente nelle prime esperienze fatte, ha una quantità di inconvenienti; non si riesce mai a ricambiare tra i due vetrini il liquido in tal maniera che siano portati via i batteri e flagellati che si attaccano sempre più numerosi alle superfici del vetro; questo se si deve conservare gli Infusori a lungo nello stesso vetrino; se si deve cambiare ogni giorno è una seccatura enorme, per riuscire a prendere colla pipetta i pochi individui viventi nella

cultura, e per pulire i vecchi preparati, o farne continuamente dei nuovi. Di fronte a questi inconvenienti non vi è altro che un vantaggio apparente: la maggior facilità di trasporto delle culture. Ma anche questo è apparente; io ho viaggiato spesso colle mie culture, senza perdere gli Infusori; avevo soltanto la cura di mettere le gocce un poco più piccole del consueto, perchè meno facilmente si rovesciassero; anzi, se le gocce sono piccole, ed il vetrino è leggermente unto con paraffina (non troppo!) si possono rovesciare e scuotere i preparati senza nessun pericolo: li ho perfino spediti per ferrovia, e trovati all'arrivo nelle medesime condizioni di quelli che avevo portato con me, per precauzione.

Naturalmente tutte queste culture sono state sempre tenute entro camere umide.

Allevamento del Glaucoma scintillans. Questa specie, che ha il pregio non piccolo di riprodursi per divisione rapidamente, molte volte al giorno durante la stagione calda, la ho allevata a partire dal 28 settembre 1904, cominciando però con un sistema che poi ho del tutto abbandonato; un solo individuo, isolato in quel giorno, fu posto in una cultura a sifone, quale già avevo usato e descritto brevemente nella mia Nota precedente. In questa cultura, nella quale scorreva acqua depurata da Infusori per filtrazione, accadde varie vicende, poco degne di nota, tra le quali anche coniugazioni tra i numerosi individui che la componevano. Finalmente il 28 di ottobre presi da questa cultura un solo Glaucoma, che trasportai in un vetrino per farne l'allevamento in gocce scoperte, secondo la tecnica descritta or ora. Rimandando alla tabella qui unita per quel che si riferisce alla rapidità della divisione nei vari mesi dell'anno, riferisco le osservazioni più notevoli che sono state fatte durante l'allevamento. Esse si riferiscono essenzialmente all'influenza degli infusi più o meno invecchiati. Mentre conservavo ogni giorno alcuni individui in infusi fatti da pochi giorni, su altri individui feci a più riprese la prova di lasciare invecchiare un poco più l'infuso. Feci queste prove quando mi sembrava che la attività riproduttiva tendesse a diminuire, senza però aspettare ad esserne tanto sicuro da non poter avere dei dubbi; non volevo condurre neppure una volta le mie culture a mal partito. In queste circostanze dunque, ogni giorno sceglievo tra i vari individui nati nelle culture alimentate con infuso nuovo, alcuni per metterli in vetrini con questo stesso infuso; altri li mettevo in altri vetrini coll'infuso più vecchio. Senza eccezione alcuna osservai che l'infuso vecchio diminuiva l'attività riproduttiva dei Glaucomi; ne trovavo, il giorno seguente, un minor numero di individui che nelle culture con infuso nuovo; naturalmente mi sforzavo di rendere uguali tutte le altre condizioni, quantità d'acqua ecc. Questa differenza si accentuava sempre più, quanto più l'infuso invecchiava, ma qualche volta molto rapidamente, in pochissimi giorni; nè era la variazione di liquido che faceva male ai miei individui, perchè se mi servivo, per una prova su in-

individui in più destinati ad essere sacrificati, sempre dello stesso infuso che andava invecchiando, il male era anche peggiore; mentre il trasporto in un infuso nuovo poteva salvare anche degli individui mal ridotti, smagrìti, con attività riproduttiva molto diminuita.

Per abitudine, io rinnovavo gli infusi prima di notare fenomeni degenerativi nelle culture; credo di averne raramente conservato uno per più di una settimana. Nella stagione calda mi servo di un infuso anche appena fatto e raffreddato, senza lasciare che si sviluppino in esso i germi che vi sono; ve ne sono sempre in abbondanza colla piccola quantità di liquido che viene trasportata insieme all'individuo che viene isolato, e la loro attività riproduttiva è sufficientemente grande per impedire che l'avidità del Glaucoma li esaurisca; d'inverno feci qualche prova di questo genere, ma ho riscontrato che è più vantaggioso avere l'infuso pronto da due o tre giorni. Non bisogna però mai temere che l'alimento sia troppo poco, quando sostanze nutrienti disciolte nel liquido vi sono in quantità sufficiente; sempre invece che sia troppo.

Ed ecco la tabella riassuntiva:

Da un Glaucoma scintillans isolato il 15 novembre 1904, si arriva il			
1° dicembre	alla generazione 26		
16 "	"	59	Nel dicembre, 57 generaz.
1° gennaio 1905	"	83	
16 "	"	114	gennaio 39 "
1° febbraio	"	142	
16 "	"	178	febbraio 68 "
1° marzo	"	210	
16 "	"	245	marzo 79 "
1° aprile	"	289	
16 "	"	329	aprile 110 "
1° maggio	"	399	
16 "	"	464	maggio 109 "
1° giugno	"	538	
16 "	"	604	giugno 136 "
1° luglio	"	678	
3 luglio	"	683	

Quali prove che è sempre mancata la copulazione? Quando avvengono 6 o 7 generazioni per giorno, anche guardando le culture due volte al giorno, si trovano parecchi individui che potrebbero essersi coniugati, per esempio, durante la notte. Ma vi sono argomenti assolutamente sicuri per affermare che ciò non è mai avvenuto; e questi argomenti hanno tanto più valore, in quanto non sono tratti dalle mie sole osservazioni, ma anche da quelle di

altri autori, compreso e primo il Maupas, a cui si devono tanti risultati importanti sulla biologia dei Protozoi, pur non essendo giusta la conclusione della degenerazione senile. Quando gli Infusori sono alimentati regolarmente e tenuti in buone condizioni, non si coniugano mai, e tanto meno tra discendenti prossimi di uno stesso individuo. Questa legge è stata tante mai volte verificata, senza che alcuna eccezione si sia osservata, che non vi è qui nulla da aggiungere. Soltanto voglio accennare che essa vale anche per quelle specie in cui la popolazione è fenomeno frequentissimo, come per il *Chilodon uncinatus*, sul quale ho fatto apposite esperienze.

Di fronte ad un numero così elevato di generazioni, in cui non si è osservato fenomeni degenerativi, che invece comparivano subito, appena si cambiavano un poco le condizioni di allevamento, in qualche prova di confronto, sia diminuendo gli alimenti, sia rinnovando meno spesso il liquido alimentare, o dando troppo infuso e poca acqua, vale a dire tutte le volte che si diminuivano gli scrupoli, non vi è che una conclusione possibile: che la degenerazione senile non esiste. Vero è che non ho fatto queste ricerche per un tempo infinito; nè evidentemente è troppo facile farle! Ma la degenerazione senile osservata dal Maupas si è verificata in tempi anche più corti di quelli che son durati i miei allevamenti. E le degenerazioni che ha osservato Calkins⁽¹⁾ nelle culture di *Paramoecium*, e che egli è riuscito a guarire per mezzo di azioni stimolanti speciali, chimiche soprattutto, si sono verificate entro pochi mesi. L'A. crede con gli stimoli che ha fatto agire sui suoi Protozoi di avere prodotto un fenomeno paragonabile alla partenogenesi artificiale degli Echinodermi ecc. Io dico invece che egli ha tolto o diminuito le influenze nocive (batteriche) che tendevano ad uccidere i suoi organismi. Non si vorrà, spero, credere che anche nelle mie culture siano avvenuti fenomeni di partenogenesi artificiale, perchè d'inverno faceva più freddo che d'estate, o perchè gli infusi alimentari non saranno stati sempre perfettamente uguali tra loro. Chè altrimenti si dovrebbe concludere che anche tutta la nostra vita è una serie di partenogenesi artificiali, dovuta al fatto che ogni giorno vi sono su di noi degli stimoli che agiscono, per es., perchè mangiamo e perchè non viviamo in un termostato di D'Arsonval; e come prova questa che se, per togliere gli stimoli esterni o almeno diminuirli, si resta senza mangiare, dopo pochi giorni si muore.

Infine voglio notare che le osservazioni del Maupas che portavano a concludere per l'esistenza di una degenerazione senile, non sono fatte tenendo d'occhio continuamente i Protozoi delle culture, giorno e notte; ciò non è

(1) Calkins. *Studien on the Life-History of Paramoecium caudatum*. Arch. entwick. Mechan. 15 B. S. 139-184, 1902; Kulagin, *Zur Biologie der Infusorien*, Physiologiste Russe, vol. 1, pagg. 269-275, 1900; Joukowsky, *Beiträge zur Frage nach der Bedingungen der Vermehrung und des Eintrittes der Conjugation bei den Ciliaten*. Verh. Nat. Med. Ver. Heidelberg (2) 6 B. S. 17-42, 1898.

praticamente possibile; anzi, la possibilità di coniugazioni era nel suo caso assai maggiore che nel mio, giacchè l'A. conservava gli Infusori in uno stesso vetrino fino a che erano giunti ad un numero di individni considerevole (parecchie centinaia), e quindi erano tra loro molto più fitti e meno stretti da legami di parentela. Una opinione sorta in base ad osservazioni fatte in tali condizioni, è evidentemente distrutta da osservazioni opposte fatte in condizioni che pongono molto più al riparo dalla possibilità di coniugazioni.

PERSONALE ACCADEMICO

Giunse all'Accademia la dolorosa notizia della morte del Socio straniero prof. **TOBIA ROBERTO THALÉN**, mancato ai vivi il 27 luglio 1905; apparteneva il defunto all'Accademia sino dal 21 luglio 1902.

V. C.