

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXIII.

1916

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXV.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1916

Chimica-fisiologica. — *Ricerche sulla composizione chimica della mucosa intestinale* (1). Nota I, di G. QUAGLIARIELLO e A. CRAI-FALEANU, presentata dal Corrispondente FILIPPO BOTTAZZI.

Sulla composizione chimica della mucosa intestinale l'unico studio finora eseguito è quello del Bottazzi (2), i cui risultati trovansi citati dal Hammarsten (3). Il Bottazzi, però, non fece che iniziare la ricerca analitica delle sostanze estratte dalla mucosa e dall'epitelio intestinale, di cui egli additò un metodo ottimo per ottenere grande quantità.

Ora noi abbiamo creduto opportuno di riprendere tali ricerche al punto in cui furono dal Bottazzi lasciate, al fine di estenderle e possibilmente di approfondirle.

Per ottenere una quantità considerevole di epitelio intestinale, il Bottazzi riempiva l'intestino, precedentemente lavato, di soluzione 1-5 % di NaF.

Noi ci siamo serviti, oltre che di questo sale, anche di acqua distillata e di soluzione di carbonato sodico, usando le quali, però, è necessario di saturarle di toluolo per ostacolare lo sviluppo dei microrganismi della putrefazione.

Abbiamo fatto le nostre ricerche sull'intestino di maiale. Preso al macello da animali appena uccisi, era subito portato al laboratorio, dove era lavato internamente con acqua di fonte tiepida, e poi diviso in pezzi eguali della lunghezza di circa 1 metro ciascuno.

I vari pezzi, riempiti del liquido estrattore e legati alle due estremità, venivano poi sospesi verticalmente sopra altrettante capsule di porcellana, nelle quali si raccoglieva il liquido che da essi filtrava durante le 12 o 24 ore che erano lasciati nella detta posizione.

1° *Esperimento* (26 marzo 1915). — Intestino di maiale, dal piloro al cieco, della lunghezza di circa 14 metri. Lo si lava per tre volte con acqua di fonte tiepida, lo si divide poi in pezzi, e si riempiono questi con acqua distillata (circa 9 litri) satura di toluolo.

Dalle anse filtrano e sono raccolti circa 2000 cm.³ di un liquido opalescente roseo. Trascorse 24 ore, i pezzi d'intestino sono vuotati del loro contenuto. Si lascia il liquido

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di fisiologia della R. Università di Napoli.

(2) Fil. Bottazzi, *Proprietà chimiche e fisiologiche delle cellule epiteliali del tubo gastroenterico*. Arch. di fisiol. I, pag. 413 (1904).

(3) O. Hammarsten, *Lehrb. d. physiol. Chemie*, VII^o Aufl., pag. 464 Wiesbaden 1910. Nell'ultima edizione di quest'opera, del 1914, curata dal Hedin, la citazione delle ricerche del Bottazzi è stata omessa, non si sa perchè, nè è stata sostituita da altre notizie sull'argomento.

a riposo per 24 ore, sotto uno strato di toluolo, e poi lo si decanta. Nel sedimento, esaminato al microscopio, si riconoscono molti aggruppamenti di cellule epiteliali, che qua e là pare riproducano la forma dei villi, e molte cellule isolate rigonfiate, non che un materiale granuloso amorfo, che sembra detrito cellulare.

Si decanta il liquido soprastante, e lo si filtra. Il filtrato è leggermente opalescente e roseo. Presenta le seguenti reazioni:

- 1°) Non coagula al calore, se non dopo aggiunta di sali neutri;
- 2°) l'acido acetico vi produce, a freddo, un precipitato, che in un eccesso di acido si ridiscioglie, ma solo in assenza di NaCl; il precipitato, ridisciolto da un eccesso di acido in assenza di NaCl, si riforma in seguito ad aggiunta di questo sale, che peraltro, da solo, non provoca precipitazione;
- 3°) il CaCl_2 diluito produce precipitazione, come pure il MgSO_4 e il $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in soluzione satura;

4°) l'HCl, l' HNO_3 e l' H_2SO_4 provocano precipitazione, ma solo il precipitato prodotto dall'HCl è solubile in un eccesso dello stesso acido.

Una parte del liquido è trattata con acido acetico, in modo da produrre la precipitazione completa delle sostanze precipitabili con questo acido. Il filtrato (neutralizzato) dà le seguenti reazioni:

1°) Coagula al calore. Il filtrato limpido, che non coagula più al calore, dà la reazione del biurete e un precipitato per aggiunta di tannino;

2°) vi si forma un precipitato per semisaturazione con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Il filtrato coagula ancora al calore.

Il liquido contiene:

Residuo secco a 110° C gr. 5,820 ‰;

Azoto totale gr. 0,840 ‰ (determinato col metodo di Kjeldahl);

Azoto del liquido liberato dalle proteine precipitabili con acido acetico gr. 0,364 ‰;

Azoto di sostanze non precipitabili mediante trattamento del liquido secondo il metodo di Schenk gr. 0,235 ‰.

II° *Esperimento* (17 aprile 1915). — Intestino di maiale, della lunghezza di circa 16 metri. Lo si lava per due volte con acqua di fonte tiepida, e lo si riempie con acqua distillata satura di toluolo (10 litri). Lo si lascia sospeso per 20 ore, durante il qual tempo filtra un liquido limpidissimo roseo (circa 3000 cm.³).

Si estrae il liquido dall'intestino, e lo si lascia in riposo per 24 ore; quindi si decanta, si filtra e si unisce questo filtrato al liquido trasudato dalle anse intestinali. Il materiale depositatosi al fondo del recipiente somiglia a quello dell'esperimento precedente.

Esame del liquido:

Residuo secco gr. 6,03 ‰,

Azoto totale gr. 0,875 ‰;

Azoto residuale gr. 0,166 ‰;

Azoto contenuto nel liquido liberato dalle proteine precipitabili con acido acetico, gr. 0,420 ‰.

Le reazioni qualitative sono in tutto simili a quelle del I° esperimento.

III° *Esperimento* (28 aprile 1915). — Intestino di maiale lungo circa 18 metri. Lo si lava due volte con acqua del Serino tiepida, e lo si divide in segmenti che vengono riempiti di soluzione all'1 % di fluoruro sodico saturata con toluolo. Si adoperano in tutto 16 litri di soluzione. Si lasciano le anse sospese per 20 ore. Filtrano circa 4 litri di liquido roseo e limpido. Si vuotano le anse intestinali. Il contenuto è lasciato a riposo per 24 ore. Si decanta e si filtra, e il filtrato è unito al liquido trasudato dall'intestino. Il materiale depositato, esaminato al microscopio, è costituito di cellule epiteliali, in generale ben conservate.

Esame del liquido:

Il liquido è leggermente giallastro, opalescente, e presenta reazione debolmente alcalina. Dà le seguenti reazioni:

- 1°) coagula al calore;
- 2°) l'acido acetico diluito vi produce abbondante precipitato, che non si ridiscioglie in un eccesso di acido;
- 3°) l'ammoniaca chiarifica completamente il liquido, per sè stesso un po' opalescente;
- 4°) il cloruro di calcio vi produce un precipitato fioccoso;
- 5°) il liquido, trattato con un eccesso di acido acetico e filtrato, dà ancora precipitato quando è semi-saturato con solfato di ammonio o è saturato con solfato di magnesio;
- 6°) il filtrato, ottenuto dopo questa ultima precipitazione, coagula al calore;
- 7°) il liquido, completamente dealbuminizzato mediante il calore, dà ancora la reazione del biurete e quella del Millon.

Determinazioni quantitative:

Residuo secco 13,45 ‰, da cui, detratti i 10 gr. di fluoruro sodico, restano gr. 3,45 ‰ di sostanze estratte;

Azoto totale gr. 0,378 ‰;

Azoto contenuto nel liquido liberato dalla proteine precipitabili con acido acetico gr. 0,262 ‰;

Azoto residuale gr. 0,129 ‰.

IV° *Esperimento* (5 maggio 1915). — Intestino tenue di maiale, della lunghezza di circa 12 metri. Lo si lava per due volte con acqua di fonte tiepida, e poi lo si divide in pezzi che vengono riempiti di soluzione 0,5 % di carbonato sodico (circa 12 litri).

Si lasciano le anse sospese per 16 ore. Durante questo tempo, filtrano attraverso la parete intestinale circa tre litri di liquido roseo e limpido. Vuotato l'intestino, si lascia in riposo il liquido per 24 ore; poi si decanta e si filtra. Il filtrato si unisce al liquido trasudato. Il materiale depositato, esaminato al microscopio, si mostra costituito di poche cellule epiteliali integre, sebbene rigonfiate, e, pel resto, di una materia granulosa amorfa, che ricorda quella già osservata nel primo esperimento.

Esame del liquido:

- 1°) non coagula al calore; coagula però se è neutralizzato;
- 2°) l'acido acetico diluito vi produce un notevole precipitato, solubile in un eccesso di acido;
- 3°) il liquido, trattato con una quantità sufficiente di acido acetico, dà abbondante precipitato; il filtrato dà un altro precipitato, quando è semisaturato con solfato di ammonio;
- 4°) dopo precipitazione con solfato di ammonio, il filtrato contiene ancora sostanze coagulabili al calore;
- 5°) il liquido dealbuminizzato dà ancora le reazioni dei peptoni.

Determinazioni quantitative:

Residuo secco gr. 13,25 ‰, da cui, detratti 5 gr. spettanti al carbonato sodico, restano gr. 8,25 ‰.

Azoto totale gr. 1,19 ‰;

Azoto del liquido liberato dalle proteine precipitabili dall'acido acetico gr. 0,484 ‰;

Azoto residuale gr. 0,366 ‰.

Dagli esperimenti descritti risulta che il liquido di estrazione dell'intestino, comunque l'estrazione sia stata fatta, cioè con acqua distillata ovvero

con soluzione di fluoruro o di carbonato sodico, contiene sempre, oltre ai sali, varie sostanze proteiche.

Di queste possiamo distinguere almeno tre o quattro specie:

1°) una o più sostanze proteiche precipitabili dagli acidi diluiti;
 2°) nel liquido liberato da queste, è sempre possibile di produrre un precipitato, benchè scarso, di altre proteine, mediante semi saturazione con solfato di ammonio. Queste proteine dovrebbero quindi essere considerate come appartenenti al tipo delle globuline;

3°) nel liquido liberato anche da questa seconda specie di sostanze trovansi ancora una o più proteine coagulabili dal calore, che corrispondono perciò a sostanze del tipo dell'albumina.

Tralasciando la distinzione fra le sostanze del secondo e del terzo tipo, distinzione che non ha fondamentale importanza, il rapporto fra le proteine precipitabili con acidi e le altre risulta quello che è indicato nella tabella riassuntiva (colonna 10^a).

TABELLA.

Composizione chimica dell'estratto acquoso d'intestino di maiale.

Num. dell'esperimento	Data	Liquido di estrazione	Residuo secco gr. o/oo	Ceneri gr. o/oo	Azoto totale (N ₁) gr. o/oo	Azoto residuale (N ₂) gr. o/oo	Azoto proteico complessivo (N ₃) gr. o/oo	Azoto delle proteine precipitabili con acido acetico (N ₄) gr. o/oo	Rapporto fra l'azoto delle proteine precipitabili con acido acetico e l'N delle altre proteine $\left(\frac{N_4}{N_3 - N_4}\right)$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1915 26.3	acqua distillata	5,82	0,61	0,840	0,235	0,605	0,476	3,7
2	17.4	" "	6,03	—	0,875	0,166	0,709	0,455	1,9
3	28.4	Na Fl 1%	3,45	—	0,378	0,129	0,249	0,116	0,87
4	5.5	Na ₂ CO ₃ 0,5%	8,25	—	1,190	0,366	0,824	0,756	11,1

I dati raccolti nella detta colonna dimostrano che il rapporto non è costante, ma che in ogni caso la proteina precipitabile con acidi è notevolmente maggiore di tutte le altre proteine contenute nel liquido di estrazione. È inoltre importante di notare come tale rapporto presenti il suo valore più elevato nel caso in cui l'estrazione fu fatta con soluzione di carbonato sodico.

Ma già, in generale, la quantità totale di sostanze proteiche estratte dall'intestino varia col variare del liquido di estrazione (vedi colonna 8^a).

La detta quantità è massima nella esperienza fatta con soluzione di carbonato sodico, minima in quella fatta con soluzione di fluoruro sodico, media nelle due esperienze con acqua distillata.

Ora questo risultato si spiega benissimo, quando si pensi che, poichè la maggior parte delle proteine dell'intestino sono solubili in alcali diluiti, il liquido estrattore più efficace debba essere una soluzione debolmente alcalina, quale è appunto quella di carbonato sodico. D'altra parte, fra l'acqua distillata e la soluzione di fluoruro sodico, che, quando è molto diluita, può essere considerata come praticamente neutra o appena un poco alcalina, si comprende come debba essere più efficace l'acqua distillata, che rigonfia e disintegra le cellule epiteliali, che non la soluzione diluita di fluoruro sodico, la quale distacca bensì le cellule epiteliali ma non le disfa, come dimostra l'esame microscopico del sedimento.

Bisogna inoltre notare che nei liquidi di estrazione, oltre alle sostanze proteiche, sono contenute molte altre sostanze organiche, come prova la cifra relativamente alta dell'azoto residuale (vedi colonna 7^a della tabella), derivante verosimilmente da prodotti di scissione di proteine alimentari (proteosi, peptone, amino-acidi). Questi prodotti, in parte si trovano già preformati nell'intestino al momento in cui l'animale è ucciso; in parte, data la presenza di fermenti, si formano dopo.

Infatti, due determinazioni eseguite nel liquido di estrazione, la prima subito dopo il vuotamento dell'intestino, la seconda dopo alcune ore, mostrano che l'azoto residuale va man mano aumentando, mentre diminuisce l'azoto proteico.

Siccome da quanto innanzi si è detto risulta che la sostanza proteica in maggior quantità contenuta nell'estratto acquoso dell'intestino è quella precipitabile con acido acetico, interessa conoscere la natura della medesima. Per i suoi caratteri di solubilità, corrisponderebbe a una mucina, o a una nucleo-proteina, o a un miscuglio di ambedue le sostanze. È noto come sia difficile il distinguere una mucina o un mucoide da una nucleo-proteina; tuttavia, avendo applicato tutti i procedimenti consigliati dagli autori a questo riguardo, ci siamo persuasi in modo assoluto che si tratta di una sostanza unica. Il fatto poi di aver potuto ottenere per tale sostanza (dopo averla purificata mediante successive precipitazioni con acido e dissoluzione in alcali e mediante lavatura con alcool ed etere) la prova della presenza, in essa, di fosforo e di basi puriniche, dimostra, in modo non dubbio, che si tratta di una nucleo-proteina.

L'assenza di mucina dall'estratto acquoso dell'intestino ci ha molto sorpresi; ma i fatti osservati sono quelli sopra detti; e, del resto, anche i caratteri fisici dello estratto acquoso, per nulla filante, confermano le osservazioni chimiche.

Può darsi che la prima lavatura dell'intestino porti via la mucina dalla superficie della mucosa, dato che vi sia; o che quella sostanza, che ordinariamente dicesi mucina (prodotto delle cellule mucose caliciformi), non sia vera mucina, ma piuttosto una nucleo-proteina avente caratteri di somiglianza con la mucina vera, pur differendone chimicamente.

In una Nota successiva pubblicheremo i risultati dell'analisi chimica della nucleo-proteina estratta dall'intestino, alla quale crediamo che debba essere conservato il nome, che le dette il Bottazzi, di *enteronucleoproteina* (enteroproteide).

Patologia vegetale. — *Sulla morfologia e sulle condizioni di sviluppo della Sclerotinia trifoliorum*. Nota del professore VITTORIO PEGLION, presentata dal Socio G. CUBONI.

Esistono numerose osservazioni intorno a questo fungo che cagiona danni abbastanza gravi nei trifogliai, soprattutto nell'Europa settentrionale; esse sono state criticamente esposte dal Coleman⁽¹⁾ le cui ricerche integrano sperimentalmente i precedenti studi di De Bary, Rehm, Eriksson, Rostrop e Brefeld. Restavano tuttavia insolute alcune questioni riflettenti lo stato conidiale o microconidiale del fungo e le condizioni che determinano la comparsa epidemica dell'infezione nei campi di trifoglio, onde essendomi offerta l'occasione, ho creduto opportuno riprendere lo studio della *Sclerotinia trifoliorum* per delucidare codeste incognite.

Il parassita ha distrutto nella scorsa stagione un piccolo appezzamento di trifoglio ladino coltivato nell'orto della Scuola agraria: dai numerosi sclerozi rimasti a fior di terra in seguito al disfacimento del colletto e delle catene di ladino, cominciarono a spuntare verso la fine dell'ottobre innumerevoli apotecii, la cui comparsa continuò durante la prima quindicina di novembre ancorchè vi fosse un notevole abbassamento di temperatura.

Ponendo alcuni apotecii maturi in scatola di Petri, si osserva dopo poche ore la caratteristica disseminazione delle spore, le quali vengono proiettate a mucchietti contro le pareti della scatola, ogni mucchietto risultando formato dalle 8 spore contenute in ogni asco. Le dimensioni di questi oscillano intorno a 175μ e le ascospore mature misurano $16-18 \times 8 \mu$.

Appena disseminate le ascospore sono atte a germinare, tanto nell'acqua distillata che nei comuni substrati nutritivi. Ho ottenuto colture pure col solito metodo di selezione in gelatina nutritizia: il fungo si sviluppa abbastanza bene in mosto gelatinizzato, meglio in gelatina di brodo di fagiuolo

⁽¹⁾ Coleman, *Ueber Scler. Trifoliorum*. Arbeiten d. K. K. Biol. Anstalt, Berlin 1907, V, pag. 469.