

Gli Infusori Ciliati del rumine sintetizzano la vitamina B?

(Nota preventiva)

È ormai provato che nei Ruminanti non è possibile provocare il tipico quadro dell'avitaminosi B. Tra le parecchie dimostrazioni di tal fatto abbiamo la suggestiva esperienza di TEYLER (1), il quale ha tenuto per oltre due anni dei bovini a riso brillante senza osservare alcun quadro di avitaminosi.

Possiamo ritenere estremamente probabile che questa sintesi della vitamina B avvenga nel rumine.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze nessun fatto ci autorizza non dico ad ammettere, ma neanche a supporre che questa sintesi possa avvenire per via puramente chimica. Dobbiamo perciò ritenere che, avvenendo per processo biologico, della sintesi della vitamina B siano responsabili gli Infusori del rumine o i Batteri o gli uni e gli altri.

La presenza di Infusori Ciliati nel rumine è stata rivelata da GRUBY e DELAFOND (2) nel 1843. I successivi lavori del COLIN (3), dello STEIN (4), dello SCHUBERG (5), del FIORENTINI (6), di BUNDLE (7), dell'EBERLEIN (8), di SHARP (9), del CUNHA (10), del SCRUMACHER, del REICHENOW (11), del DOGIEL (12), ecc., hanno sempre più approfondito lo studio della Sistematica e della Morfologia di questi Protozoi.

In questi ultimi anni i lavori del BECKER (13) e della Scuola del Mangold (14), e particolarmente quelli dell'USUELLI (15) sono stati diretti a chiarire l'importanza che gli Infusori Ciliati esplicano nella fisiologia della digestione dei Ruminanti.

(1) Citato dall'USUELLI in « Gli Infusori Ciliati che vivono nell'apparato digerente degli Erbivori ». - « Clinica Veterinaria », 1930.

Gli Infusori Ciliati sono sempre presenti nel rumine degli Ovini e dei Bovini in quantità variabili, ma in genere sempre rilevanti, aggirandosi il numero di detti Infusori tra i 600 e 1200 per mm.³ di contenuto del rumine, tantochè, come hanno dimostrato le ricerche della Scuola del Mangold, circa il 10-20% dell'azoto totale del contenuto del rumine appartiene agli Infusori.

Interessanti sono le varie funzioni che esplicano detti Infusori nella digestione e nutrizione dei Ruminanti.

Infatti, oltre alla constatazione che gli Infusori dei Ruminanti anche in termostato assumono amido e formano glicogene, consumando poi gradatamente l'uno e l'altro carboidrato (TRIER), è stato pure osservato che *in vivo* l'assunzione dell'amido e specialmente la formazione del glicogene sono più intense che in termostato (USUELLI).

Molti Autori hanno assegnato agli Infusori Ciliati una grande importanza nella digestione della cellulosa. Le esperienze dell'USUELLI hanno però dimostrato che la quantità di cellulosa che gli Infusori ingeriscono è assolutamente minima di fronte alla quantità di cellulosa presente nel rumine; l'USUELLI non esclude in modo assoluto che i Ciliati possano digerire la cellulosa ma, in base alle Sue ricerche si rifiuta di credere che questo fenomeno possa avere un valore quantitativo apprezzabile per gli Erbivori (16).

KRAUS ha ammesso nel rumine una sintesi dei grassi e l'ha attribuita agli Infusori. È sicuramente accertato che l'introduzione nel rumine di una notevole quantità di grassi riesce mortale per gli Infusori. Da ricerche di MANGOLD e USUELLI risulta che l'azione esiziale dei grassi sugli Infusori è dovuta agli acidi grassi, inquantochè il *potere tampone* del contenuto del rumine è debole ed una notevole produzione di acidi grassi fa abbassare fortemente il pH.

Al comportamento degli Infusori di fronte alle proteine, particolarmente per ciò che concerne l'apporto all'Erbivoro di « proteina animale », son legati problemi suggestivi e di grande interesse; ma il significato intrinseco della questione è ancor oggi pieno di dubbi e d'interrogativi perchè possa essere chia-

ramente interpretato. Quel che è certa è la trasformazione delle proteine vegetali dell'alimento in protine protozoarie.

Oltre alle funzioni su esposte, sono pure attribuite agli Infusori un'azione meccanica nel senso che la locomozione dei Ciliati — dato il loro enorme numero e la grande vivacità dei loro movimenti — favorirebbe l'intimo rimescolamento dell'alimento (e quindi anche probabilmente l'attacco della cellulosa per opera dei Batteri) e un'azione batteriofaga, la quale, limitando i processi fermentativi che si svolgono nel rumine, regolizzerebbe l'utilizzazione degli alimenti.

Il metodo ideale per vedere se gli Infusori del rumine hanno la proprietà di sintetizzare la vitamina B sarebbe stato quello di coltivarli su un terreno devitaminizzato e saggiare il potere della coltura.

Con un metodo simile è infatti riuscito SCHEUNERT (17) a dimostrare la sintesi delle vitamine di alcuni batteri, ma per gli Infusori del rumine ciò non era almeno per ora possibile, inquantochè la coltivazione *in vitro* delle specie Ciliate, che vivono nell'apparato digerente degli Erbivori, è — a differenza di quella degli Infusori che si sviluppano nelle infusioni di fieno e di quella del terreno (che è così brillantemente riuscita al GRANDORI) — estremamente difficile.

Già l'USUELLI aveva compiuto sul problema della sintesi della vitamina B per opera degli Infusori alcune ricerche preliminari, isolando gli Infusori del rumine dei Bovini con la tecnica che descriveremo più avanti, essiccandoli a bassa temperatura e somministrandoli giornalmente a dosi variabili a piccioni mantenuti a riso brillante.

L'USUELLI osserva in proposito: « Ben si capisce che la somministrazione del corpo di un dato organismo se riesce ad impedire l'insorgere delle avitaminosi non prova ancora che quell'organismo sia capace di sintetizzare la vitamina in questione, perchè le vitamine possono essere state semplicemente immagazzinate; così l'alimentazione esclusiva con carne di cane cruda non dà luogo a fenomeni di avitaminosi B; ciò nonostante il cane è senza dubbio un animale incapace di sintetizzare la vitamina B; le esperienze del PUGLESE, mie e di molti

altri allievi del PUGLESE lo hanno in questi ultimi anni ampiamente documentato.

Però quando una quantità assolutamente minima del corpo di un organismo ha alto potere vitaminico, allora dobbiamo logicamente ammettere che quell'organismo non può aver solo immagazzinato, ma bensì sintetizzato le vitamine. Così il lievito di birra alla dose giornaliera di 10 centigrammi (PUGLESE e Suoi allievi) è capace di mantenere per lunghi mesi in ottime condizioni il piccione a riso brillante; ciò dimostra che il Saccaromicete sa sintetizzare la vitamina B » (18).

Estendendo le ricerche dell'USUELLI sul problema dell'eventuale sintesi della vitamina B per opera degli Infusori, ho saggiato, per Suo consiglio, il potere antiberiberico

- a) della frazione infusoria del rumine
- b) » » batterica » »
- c) » » alimentare » »

Era infatti necessario comparare l'eventuale azione antiberiberica della frazione infusoria con quella della frazione batterica e della frazione alimentare, inquantochè nell'endoplasma dei Ciliati, che vivono negli stomaci dei Ruminanti, sono sempre presenti batteri e particelle alimentari.

Prelevavo il contenuto del rumine al macello e, trasportato immediatamente al laboratorio, diluivo il contenuto del rumine con acqua, centrifugavo finchè, osservando al microscopio una goccia del liquido sovrastante al sedimento, non si vedevano più Infusori. Decantavo con precauzione, conservando il liquido decantato, ricchissimo di Batteri. Ridiluivo con acqua il sedimento e ancora lo centrifugavo e ridecantavo.

Il sedimento dell'ultima centrifugazione risultava di Infusori e di grosse particelle alimentari.

Ridiluendo abbondantemente con acqua detto sedimento, le grosse particelle alimentari precipitavano assai più rapidamente degli Infusori. Pipettavo il liquido contenente gli Infusori, ridiluivo il deposito e così via fin quando sulle particelle alimentari che costituivano il deposito non vedevo più Infusori.

Il liquido, man mano pipettato e contenente gli Infusori, veniva filtrato; sul filtro erano così raccolti i soli Infusori (con qualche impurità).

Il filtrato era unito a quello delle prime decantazioni e il tutto ancora filtrato. Le piccole particelle alimentari restano sul filtro, mentre i Batteri, nella loro grande maggioranza, passano nel filtrato, naturalmente assieme alle sostanze solubili. È a questo filtrato che per brevità abbiamo assegnato il nome di *frazione batterica*. È però necessario aggiungere che in questa frazione sono comprese le sostanze solubili del contenuto del rumine.

Le particelle alimentari, man mano raccolte, venivano a loro volta poste su un filtro, lavate con acqua e poi essicate a bassa temperatura (40° circa); a bassa temperatura venivano pure essicate le frazioni infusoarie e batteriche.

Esperimentammo complessivamente su 16 piccioni di circa 1 anno di età e dal peso iniziale variante tra i 260 e 360 gr.

Il primo gruppo di tre piccioni (n. 1; n. 2; n. 3) fu tenuto a riso brillato solo, e ciò allo scopo di controllare che veramente il riso da noi adoperato era tale da provocare il classico quadro della polineurite sperimentale.

Il secondo gruppo di tre piccioni (n. 4; n. 5; n. 6) fu tenuto a riso brillato + gr. 0,10 di lievito di birra al giorno per animale. Nel piccione n. 4 la somministrazione del lievito fu iniziata subito; nel piccione n. 5 la somministrazione del lievito fu iniziata al 16° giorno, quando l'abbattimento dell'animale e la diminuzione della temperatura corporea già preludevano al quadro polineuritico. Nel piccione n. 6 la somministrazione del lievito fu iniziata al 24° giorno a quadro polineuritico conclamato.

Queste esperienze col lievito furono pure condotte a scopo di controllo in quanto, come risulta dalle ricerche della Scuola del PUGLESE (19) e dell'ABDERHALDEN (20), il lievito costituisce, per così dire, la pietra di paragone degli alimenti anti-beriberici.

Il terzo gruppo comprese sei piccioni (n. 7; n. 8; n. 9; n. 10; n. 11; n. 12), ai quali fu somministrato, fin dall'inizio dell'esperimento, oltre al riso brillato, la frazione infusoaria a dosi variabili e precisamente di gr. 0,10 al giorno al piccione n. 7; di gr. 0,50 al piccione n. 8; di gr. 1,00 al piccione n. 9;

di gr. 2,00 al piccione n. 10; di gr. 4,00 al piccione n. 11; di gr. 5,00 al piccione n. 12.

Il quarto gruppo di tre piccioni (n. 13; n. 14; n. 15) fu tenuto a riso brillato + gr. 2,00 di frazione alimentare dall'inizio dell'esperimento per i n. 13 e 14; e di gr. 1,00 ancora di frazione alimentare per il piccione n. 15.

Il quinto gruppo di due piccioni (n. 16; n. 17) fu invece tenuto a riso brillato + gr. 0,25 di frazione batterica per il n. 16; + gr. 1,00 della stessa frazione per il piccione n. 17 dall'inizio dell'esperienza.

I protocolli delle singole esperienze saranno riportati nel lavoro generale.

Il comportamento del peso corporeo dei singoli animali risulta chiaramente dai grafici, nei quali la crocetta segna il giorno di morte degli animali e la freccia indica che gli animali erano ancora in vita (e in buone condizioni di salute) quando furono posti fuori esperimento.

Riassunto delle esperienze

1°) I piccioni n. 1; n. 2; n. 3 del primo gruppo, tenuto a riso brillato solo, morirono tutti di polineurite tra il 17° e 25° giorno. Aggiungeremo che al piccione n. 3 la somministrazione di gr. 1,00 di polvere di frazione infusoaria, alla mattina del 25° giorno, quando era già scoppato il quadro polineuritico, non riuscì ad evitare la morte dell'animale, avvenuta il giorno stesso.

2°) Il lievito di birra secco alla dose giornaliera di gr. 0,10 esplicò netta e sicura azione anti-beriberica, sia preventiva che curativa.

3°) La polvere di frazione infusoaria somministrata dall'inizio dell'esperimento a dosi variabili assieme al riso brillato, non esplicò alcuna azione anti-beriberica alla dose di gr. 0,10 sul piccione n. 7, che morì di polineurite al 24° giorno. La dose di gr. 0,50, gr. 1,00 e gr. 2,00 al giorno prolungò di qualche giorno o di qualche settimana la vita dei piccioni n. 8; n. 9 e n. 10; ma non riuscì ad evitare lo scoppio del quadro polineuritico e la morte degli animali che avvenne rispettivamente alla 33.a, 45.a e 59.a giornata. *La polvere di frazione*

infusoria solo alla dose di gr. 4,00 e di gr. 5,00 giornalieri, rispettivamente nei piccioni n. 11 e n. 12, riuscì ad esplicare una netta e sicura azione preventiva antiberberica.

4° La frazione costituita dalle particelle alimentari isolate dal rumine alla dose di gr. 1,00 al giorno fu insufficiente a mantenere in vita il piccione n. 15 a riso brillato; probabilmente però prolungò alquanto la vita del piccione, poichè questo morì in 40.a giornata. Invece, usata dall'inizio dell'esperimento la dose di gr. 2,00 al giorno, la frazione alimentare del rumine esplicò sicura azione antiberberica.

5° Quella che per brevità abbiamo chiamata frazione batterica del contenuto del rumine (ma nella quale, come ho già detto, erano comprese anche le sostanze solubili) alla dose di gr. 0,25 al giorno prolungò alquanto la vita del piccione n. 16, ma fu insufficiente ad evitare lo scoppio del quadro polineuritico e la morte dell'animale che avvenne al 51° giorno. Alla dose di gr. 1,00 al giorno la frazione batterica del contenuto del rumine esplicò nel piccione n. 17 piena azione antiberberica.

CONCLUSIONE

La frazione infusoria del contenuto del rumine esplicò azione antiberberica sul piccione alimentato a riso brillato, solo alla dose giornaliera di gr. 4,00, cioè a una dose doppia di quella della frazione alimentare e una a dose quadrupla di quella della frazione batterica. Questi risultati ci autorizzano a ritenere estremamente improbabile che la fauna protozoaria del rumine sia capace di sintetizzare la vitamina B; appoggiamo invece le esperienze e le concezioni dello SCHEUNERT, secondo il quale alcune specie di Batteri che vivono nel rumine sono capaci di operare detta sintesi della vitamina B.

BIBLIOGRAFIA

1. — USUELLI F. 1930 — Gli Infusori Ciliati che vivono nell'apparato digerente degli Erbivori. « Clinica Veterinaria ».
2. — GRUBY 12 DELAFON 1834. — Recherches sur des animaux se dévotant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 17:1304-1308. Recueil de Médecine Vétérinaire Pratique, 20:859-866.
3. — COLIN G. 1854. — Traité de Physiologie comparée des Animaux domestiques. Paris.
4. — STEIN F. 1858 — Ueber mehre neue im Pansen der Wiederkäuer lebende Infusionsthiere. Abh. d. Kais. Böhm. Ges. Wiss., 10:69-70.
5. — SCHUBERG A. 1892. — Bemerkungen zu den Untersuchungen des Herrn Dr. Angelo Fiorentini über die Protozoen Wiederkäuermagens. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk., 11:760-761.
6. — FIORENTINI A. 1889. — Interno ai protisti dello stomaco dei bovini. Pavia. — 1890. — Interno ai protisti dell'intestino degli equini. Pavia. — 1890. — Sur les protistes de l'estomac des bovidés. Jour. de Microg., 14: 23-28; 79-83; 178-183. — 1892. — Antwort des Dr. Angelo Fiorentini dem Dr. Schuberg. Centralbl. f. Bakt. u. Parasit., 11:758-760.
7. — BUNDLE A. 1895. — Ciliate Infusorien im Cöcum des Pferdes. Zeitschr. f. wiss. Zool., 60:284-350.
8. — EBERLEIN R. 1895. — Über die im Wiederkäuermagen ciliaten Infusorien. Zeit. f. wiss. Zool., 59:233-304.
9. — SHARP R. G. 1914. — Diplodinium caudatum with an account of its neuromotor apparatus. Univ. Calif. Pub. Zooll., 13:43-122.
10. — CUNHA A. M. DA 1914. — Sarcos ciliados do estomago dos ruminantes domesticos do Brasil. Mem. Inst. Osw. Cruz., 6:58-68.
11. — REICHENOW E. 1920. — Die Wiederkäuerninfusorien verwandte Formen aus Gorilla und Schimpanze. Arc. f. Prot., 41:1-33.
12. — DOGIEL V. 1923. — Cellulose als Bestandteil des Skelettes bei einigen Infusorien. Biol. Zentralbl., 43:289-291.
13. — BECKER E. R., J. A. SCHULZ AND M. A. EMMERSON. 1929. — A comparative study of the digestion of proteins and carbohydrates in goats during infusoria free and infected periods. Proc. Natl. Acad. Sci., 15:691-693.
14. — MANGOLD E. 1929. — Handbuch der Ernährung u. d. Stoffwechsels d. landw. Nutztiere. Berlin. Springer. Bd. II S. 160.

15. — MANGOLD E. UND USUELLI F. 1930. — Die Schädliche Wirkung der Milch und der Veränderung der H. - Ionenkonz. auf die Infusorien des Wiederkäuer. (In corso di pubblicazione).
- USUELLI F. 1930. — Stärkeaufnahme und Glykogenbildung der Panseninfusorien. Wissenschaftliches Archiv. für Landwirt. Abt. B. Tierernährung und Tierzucht. Bd.
16. — USUELLI F. 1930. — Das Verhalten der Panseninfusorien gegenüber Cellulose und grünen Pflanzenteilen. Wiss. Arch. f. Land. Abt. B. Bd. 3; H. 2.
17. — SCHEUNERT A. und M. SCHIERLICH. 1927. — In Bethe, Bergmann, Embden, und Ellinger. Handb. norm. u. path. Phys., Berlin.
- 1933. — In Biochemische Zeitschrift.
18. — USUELLI F. — Op. cit.
19. — PUGLIESE A. 1925. — Avitaminosi e Ricambio. « Monografie di Chimica Biologica », II e III. Cappelli, Bologna.
- USUELLI F. 1926. — L'alimentazione autoclavata. « Bioc. e Ter. Sper. ».
- LACCHI M. 1928. — L'azione integrativa del lievito di birra, nell'alimentazione avitaminata ed autoclavata. « Clinica Veterinaria ».
- NECKI F. 1929. — Il lievito di birra e le alimentazioni incongrue. « Bioch. e Ter. », XVI, Fasc. 10.
20. — ABBERHALDEN e WERTHEIMER. 1922. — « Arch. ges Phys », CVXC IV.

