

Stato attuale delle ricerche sulla nutrizione dei Protozoi

Mentre PASTEUR, già nel 1858-60 dimostrava che organismi senza clorofilla possono fare la sintesi dei loro costituenti da sali d'ammonio e dall'acido tartarico, solo nel 1890 MIGUEL e BEJERINK iniziavano lo studio delle alghe in coltura pura.

Le prime colture dei Protozoi risalgono ad OGATA (1893) con *Polytoma uvella*; OEHLER (1916-24) isolò in coltura pura alcune Amebe, Flagellati e Ciliati, e dimostrò per primo che anche i Protozoi che nelle condizioni naturali si nutrono di batteri e lieviti, possono essere coltivati in assenza di elementi viventi in liquidi nutritizi appropriati. Ma nonostante questo brillante inizio nello studio delle esigenze fisiologiche e della vita dei Protozoi, molti e famosi Autori continuarono a lavorare colle celebri infusioni di fieno e di insalata, traendone conclusioni sul determinismo della sessualità, sulla ereditarietà, parlando di condizioni costanti delle colture da loro osservate, quando la flora batterica delle infusioni era sovente sconosciuta e variabile.

E. ed M. CHATTON mostrarono, lavorando con colture letobatteriche, o nutrendo i loro ciliati con specie definite e pure di batteri, quanto influisca sulla sessualità il fattore « specie batterica ». Essi classificarono infatti i batteri da loro osservati in zigogeni e azigogeni e dimostrarono che i prodotti del metabolismo batterico, specialmente l'acido piruvico, hanno un'importanza capitale sulla coniugazione degli infusori.

DOFLEIN stesso cadde nell'errore di definire un intero gruppo di flagellati « Zucherflagellaten », perchè vide che in coltura impura questi flagellati dimostravano di utilizzare largamente i glucidi, senza però domandarsi se i flagellati li usufruissero direttamente oppure usufruissero i prodotti di demolizione dei glucidi dovuti ai batteri, o se infine si nutrissero degli stessi batteri che si erano sviluppati, favoriti dalla presenza di zuccheri nel liquido nutritizio.

Da questi soli esempi si può rilevare come sia assolutamente necessario per gli studi di biologia dei Protozoi il lavorare in coltura pura, intendendo per coltura pura *cultura abatterica e unispecie di protozoi*.

E. G. PRINGSHEIM (1921) per primo, realizzando di nuovo la coltura pura di *Polytoma uvella* incominciò, componendo il proprio *milieu*

standard con sostanze chimicamente definite, lo studio fisiologico di una specie di protozoi. Vide che i glucidi non hanno alcun effetto sulla crescita e dimostrò che l'acido acetico ed altri acidi grassi sono altamente favorevoli.

Con la cultura pura di *Glaucoma pyriformis* (LWOFF, 1921-29) e con le ricerche sui vari flagellati (*Polytoma uwella*, *Euglena gracilis*, *Chlamydomonas agloiformis*, *Haematococcus fluviialis* (LWOFF, 1921-32; LWOFF e DUSI 1929-31), si iniziano le ricerche biochimiche sulla nutrizione dei Protozoi.

Spetta poi a LWOFF il merito (1932) di aver stabilito una classificazione fisiologica dei Protozoi, che, se pure non ancora perfetta, dimostra bene gli stadi evolutivi delle progressive restrizioni dei poteri di sintesi nel metabolismo, stadi che corrispondono ad evoluzioni morfologiche delle specie.

La terminologia della presente nota è adoperata nel senso dato da A. LWOFF nella seguente tabella.

Classificazione fisiologica dei microrganismi
(A. LWOFF, 1932)

METATROFI Un alimento azotato complesso (peptone) è indispensabile.		FOTOMETATROFI <i>Euglena pisciformis</i>	OXIMETATROFI <i>Euglena gracilis</i> all'oscurità.	APLOMETATROFI <i>Glaucoma pyriformis</i>
MESOTROFI Sintesi dei protidi, partendo da NH ₃ : alimento azotato: nitrato, sale di ammonio, o acido aminico. Un composto organico (azotato o carbonato) è indispensabile.		FOTOMESOTROFI <i>Euglena deses</i>	OXIMESOTROFI <i>Polytoma uwella</i>	APLOMESOTROFI Gran parte dei Bacteri e Funghi.
AUTOTROFI Alimento azotato e carbonato minerale.	CHEMIOAUTOTROFI Bacteri nitrificanti.	FOTOAUTOTROFI La maggior parte delle piante verdi.		
PROTOTROFI Assimilazione dell'azoto molecolare.				
	CHEMIOTROFI Assimilano CO ₂ coll'ossidazione di composti inorganici.	FOTOTROFI Assimilano CO ₂ colla fotosintesi.	OXITROFI Un composto carbonato organico indipendente è indispensabile, qualunque sia l'alimento azotato.	APLOTROFI L'alimento azotato organico può servire da fonte di carbonio.

LWOFF divide, come E. CHATTON (1926), i Protisti in:

Protisti Procarioti, sprovvisti di un nucleo definitivo e di mitocondri individualizzati (Bacteri e forme affini);

Protisti Eucarioti, provvisti di nucleo e mitocondri (Protozoi in senso lato).

Divide poi i Protisti Eucarioti in (A. LWOFF 1932)

{	Clorofiti (possiedono clorofilla e uno o più plastidi).
	Leucofiti (posseggono plastidi, ma non clorofilla).
	Protozoi (che non hanno nè plastidi nè clorofilla).

Già parecchi protozoologi, tra cui DOFLEIN, e più recentemente in modo speciale PASCHER (1916-1930), avevano dimostrato con basi unicamente morfologiche che l'evoluzione nei Protozoi avviene secondo lo schema clorofiti-leucofiti-protozoi. Infatti, a molte forme verdi corrispondono forme bianche che differiscono unicamente per l'assenza di clorofilla. Ad esempio:

Ai clorofiti seguenti corrispondono i leucofiti seguenti:

- | | |
|--------------------------------|--------------------|
| <i>Cryptomonas</i> | <i>Chilomonas</i> |
| <i>Pyramidomonas</i> | <i>Polytomella</i> |
| <i>Chlamydomonas</i> | <i>Polytoma</i> |
| <i>Chlorogonium</i> | <i>Hyalogonium</i> |
| <i>Euglena</i> | <i>Astasia</i> |

LWOFF nella sua monografia studia in dettaglio i caratteri morfologici e fisiologici di questi vari generi, e dimostra che l'evoluzione morfologica è convalidata da una corrispondente evoluzione fisiologica, cioè esiste una successiva perdita del potere di sintesi, un bisogno di sostanze nutritive sempre più complesse. In particolare, catalogando in base alle condizioni massime di sintesi, si può dire che i clorofiti sono fototrofi, i leucofiti oxiotrofi, i Protozoi sono aplotrofi e metatrofi.

I Leucofiti

Appartengono ai leucofiti tutti i flagellati stabilmente incolori che possiedono un leucoplasto e sono capaci di fare la sintesi delle riserve glucidiche.

Il primo leucofita studiato fu *Polytoma uvella* (PRINGSHEIM, 1921) (A. LWOFF, 1925-32).

Lo studio della nutrizione azotata di *Polytoma uvella* mostra che questo flagellato è capace di utilizzare tutti i peptoni, anche i più idrolizzati, gli aminoacidi, e perfino l'ammonio (in questo caso è assolutamente indispensabile che sia presente una fonte carbonata organica). Il potere di sintesi delle sostanze azotate di questo flagellato è dunque molto alto. L'azione di una fonte carbonata organica indipendente è sempre necessaria per ottenere delle buone colture.

Le ricerche di A. LWOFF hanno precisato ed esteso le precedenti fatte da PRINGSHEIM.

Molti aminoacidi sono stati provati, e i migliori risultati si ottennero con l'asparagina, la cistina, la glucosamina e la glicocola. Le colture in un mezzo nutritivo composto con uno solo di questi aminoacidi sono poverissime (1 individuo per mm.³); l'aggiunta di acido acetico provoca una moltiplicazione rapida ed abbondante (1000-1500 individui per mm.³). Molti composti organici carbonati furono sperimentati: solo l'acido butirrico e l'amido solubile (secondo ZULKOWSKY) possono sostituire l'acido acetico come nutrimento carbonato. L'acido butirrico dà delle colture abbondanti come l'acido acetico, mentre l'amido solubile, pur dando delle buone colture (150-250 individui per mm.³), non può rivaleggiare con l'effetto dei due acidi grassi inferiori.

VOLKONSKY (1930), con una serie di ricerche di fine citologia, riesce a mettere in evidenza con colorazioni elettive il leucoplasto di *Polytoma uvella*. La forma del leucoplasto è ramificata e molto simile alla forma del cloroplasto delle *Chlamydomonadinae* da cui il genere *Polytoma* deriverebbe per perdita della capacità di formare clorofilla. Il leucoplasto serve alla sintesi delle sostanze glucidiche di riserva poichè i granuli di paramilo si sviluppano e ingrandiscono racchiusi nelle maglie del leucoplasto, cosa che del resto era nota e già dimostrata per i leucoplasti delle piante superiori (GUILLERMOND). Ma il plasto subisce delle variazioni importanti in estensione e spessore delle ramificazioni, a seconda che i liquidi nutritivi in cui si sviluppa *Polytoma uvella* richiedono una maggiore o minore sintesi. Lasciando fissa la presenza e la concentrazione dell'acido acetico (fonte carbonata) e variando le fonti azotate, VOLKONSKY osservò che quando l'alimento azotato è un sale d'ammonio (sintesi massima) il leucoplasto è sviluppato al massimo, è ispessito, e ricopre tutta la superficie del corpo, lasciando poche aree libere.

Le ramificazioni del leucoplasto sono più rade quando *Polytoma uvella* sintetizza i costituenti citoplasmatici da un aminoacido, e sono ridotte al minimo quando il liquido nutritivo è composto di peptoni.

Dalle sue ricerche istochimiche VOLKONSKY conclude che il leucoplasto non è solo deputato alla sintesi dei glucidi di riserva, ma deve avere pure una importante funzione nella fissazione e nel metabolismo dei corpi azotati.

L'identità di comportamento rispetto alla nutrizione carbonata, di *Polytoma uvella* (flagellato stabilmente incolore e possedente un leucoplasto) e di *Euglena gracilis* (flagellato con cloroplasto) privata della funzione clorofilliana, servirono di base ad A. LWOFF, nella sua classificazione fisiologica dei microrganismi, per la creazione di una nuova categoria avente dei bisogni carbonati speciali. È la categoria degli organismi *oxitrofi*, per i quali *un alimento organico carbonato indipendente è indispensabile, qualunque sia l'alimento azotato.*

Le ricerche ulteriori su altri leucofiti e clorofiti privati della funzione clorofilliana dimostrarono quanto fosse necessaria la creazione di un nuovo gruppo fisiologico che tenesse conto delle loro esigenze di carbonio. Ma più tardi, man mano che nuovi dati sulla nutrizione di altri leucofiti e clorofiti privati della funzione clorofilliana si aggiungevano ai vecchi, LWOFF notò che la definizione dell'oxitrofia era troppo rigida e che in realtà per alcune specie l'alimento organico carbonato indipendente non era *indispensabile se pure altamente favorizzante*. Osservò che, stabilendo un *coefficiente di oxitrofia* (rapporto fra il massimo numero degli organismi sviluppatasi in un liquido nutritivo con acido acetico e il numero degli organismi sviluppatasi nello stesso mezzo senza acido acetico) per ciascuna delle specie studiate, non esistevano demarcazioni nette, ma che esisteva una serie di valori intermedi fra gli organismi strettamente oxitrofi e gli organismi meno oxitrofi (*Polytomella agilis*, coeff. di oxitrofia 6 - *Astasia Chattoni*, coefficiente di oxitrofia 40 - *Polytoma caudatum* var. *astigmata* coefficiente di oxitrofia 100 - *Polytoma uvella* coefficiente di oxitrofia 1000). L'*oxitrofia* è definita perciò ora come *la condizione fisiologica degli organismi ai quali un alimento carbonato organico indipendente è indispensabile in più dell'alimento azotato, o sullo sviluppo dei quali gli alimenti carbonati organici esercitano un'azione favorizzante specifica* (A. LWOFF, 1935). Lo studio comparativo delle esigenze carbonatate e azotate delle differenti specie dei protozoi è altamente interessante poichè ciascuna specie ha esigenze metaboliche differenti, e quindi, come per i batteri, i caratteri fisiologici metabolici possono servire come uno dei criteri per la differenziazione delle varie specie dei protozoi:

Sostanze	<i>Polytoma uvella</i> (LWOFF PRING)	<i>Polytoma caudatum</i> var. <i>astigmata</i> (LWOFF e PROVASOLI)	<i>Polytoma dorso-ventrale</i> PROVASOLI	<i>Polytomella agilis</i> (A. LWOFF)	<i>Chilomonas paramoecium</i> (LOEFFER, LWOFF e DUSI)	<i>Astasia Chattoni</i> (A. LWOFF, e A. LWOFF e H. DUSI)
Asparagina	—	—	—	—	—	—
Asparagina acetato	++	—	—	—	++	++
Peptone di seta	—	—	—	+	+	+
Peptone di seta + acetato	++	++	++	++	++	++
Peptone di seta + propionato	—	+	—	++	++	+
Peptone di seta + butirrato	++	+	++	++	++	++
Peptone di seta + isobutirrato	—	—	—	+	++	+
Peptone di seta + valerianato	—	—	—	++	++	++
Peptone di seta + caproato	—	—	—	++	++	++
Peptone di seta + lattato	—	—	—	—	—	++
Peptone di seta + piruvato	+	+	+	—	—	++
Peptone di seta + amido solubile	+	+	+	+	+	+

— = coltura povera o poverissima.
 + = crescita leggera.
 + = crescita buona.
 ++ = crescita ottima.

Come si vede dall'annessa tabella, vi sono delle rilevanti differenze sia nell'assimilazione di un numero maggiore o minore di acidi grassi, come pure differenze nel potere di sintesi, a partire da composti azotati più o meno complessi. Si sono fatte anche molte ricerche sulla latitudine del pH favorevole, ma sembra che questo non debba essere un carattere stabile poichè si sono trovati ceppi provenienti da diverse località che pur essendo morfologicamente e fisiologicamente identici avevano un potere più o meno lato di resistenza ad acidità o basicità più elevate. Al contrario sembra esistere una reale stabilità nei caratteri fisiologici del

potere di sintesi, poichè parecchi ceppi di una stessa specie provenienti da località d'Europa differenti, sia di latitudine che di temperatura, si sono dimostrati fisiologicamente stabili (PROVASOLI, inedito 1937). A. LWOFF inoltre dà un'accurata comparazione dei risultati ottenuti coi vari leucofiti studiati in coltura pura, osserva che finora un solo acido grasso è di comune utilizzazione a tutti i leucofiti. Infatti se gli acidi acetico, propionico, butirrico, isobutirrico, valerianico, caproico, piruvico, lattico e l'amido solubile possono servire di alimento carbonato agli oxiotrofi, solo l'acido acetico e l'amido solubile sono comuni a tutti. Si sono dimostrati senza azione finora sugli oxiotrofi gli acidi citrico, malonico, ossalico, tartarico, succinico e i seguenti zuccheri: xilosio, galattosio, glucosio, levulosio, saccarosio, lattosio, maltosio, come pure la destrina. Il fatto che finora solo l'acido acetico fosse utilizzato da tutti i leucofiti, come pure da tutti i clorofiti privati della funzione clorofilliana, come base per la sintesi delle sostanze glucidiche di riserva (amido e paramilo), ha spinto LWOFF ad avanzare un'interessante ipotesi di lavoro: l'acido acetico sarebbe una delle tappe e probabilmente uno dei primi prodotti della sintesi dell'amido nella funzione clorofilliana. Questa ipotesi provocherà certamente ricerche accurate e sempre più precise sull'amilogenesi, specialmente perchè, per tali lavori, i leucofiti sono un materiale preziosissimo, avendo essi un plasto, ma non la clorofilla. Ora le ricerche di LWOFF, dimostrano che il leucoplasto dei leucociti è funzionalmente identico al cloroplasto dei leucofiti privati della funzione clorofilliana con una lunga permanenza al buio; perciò le conclusioni riguardanti la sintesi amilacea del leucoplasto potranno portare nuova luce anche alla conoscenza del complicato fenomeno dell'amilogenesi dei vegetali.

I Clorofiti

Secondo la definizione di A. LWOFF clorofiti sono quei Protozoi che sono provvisti di uno o più plasti con clorofilla. Appartengono a questo gruppo tutti i flagellati verdi. Parecchi ricercatori si sono serviti dei clorofiti privati della funzione clorofilliana per la comparazione coi leucofiti. Importanti a questo riguardo sono le ricerche di A. LWOFF e H. DUSI (1929-34) con *Euglena gracilis* (flagellato verde). *Euglena gracilis* alla luce è fotoautotrofa e sintetizza i propri componenti citoplasmatici mediante il processo di fotosintesi, a partire da sali d'ammonio e CO₂ atmosferico. *Euglena gracilis* all'oscurità perde facilmente la propria clorofilla, pur mantenendo la possibilità di risintetizzarla se rimessa alla luce. La coltura all'oscurità fu realizzata in un liquido peptonato, che dava scarso sviluppo.

Gli Autori con l'aggiunta di acido acetico ottennero colture abbondantissime. Durante tutto il procedere delle ricerche, gli Autori constatarono che l'aggiunta di una fonte carbonata organica indipendente era grandemente favorizzante. L'abolizione della funzione clorofilliana induce quindi grandi trasformazioni sul potere di sintesi delle sostanze carbonatate. Mentre la razza alla luce usufruisce del CO₂ atmosferico per fabbricare le sostanze glucidiche di riserva, la razza all'oscurità ha bisogno per continuare la propria attività amilogenica di una fonte carbonata organica indipendente (acido acetico o acidi grassi inferiori). L'acido acetico e alcuni acidi grassi inferiori possono quindi servire da alimento al plasto che partendo da tali sostanze sintetizza l'amido come ne era capace prima, alla luce, mediante il processo di fotosintesi clorofilliana. Rispetto alla nutrizione carbonata *Euglena gracilis* all'oscurità è oxirofa e si comporta quindi come i leucofiti il cui plasto è stabilmente incolore. Ma con la soppressione della funzione clorofilliana anche la nutrizione azotata si modifica. *Euglena gracilis* perde all'oscurità il potere di sostituire i suoi componenti citoplasmatici dai nitrati e dall'asparagina. La sintesi massima è realizzata con un peptone (di seta) fortemente idrolizzato. Aminoacidi soli o una miscela di vari aminoacidi non poterono sostituire il peptone di seta.

Euglena gracilis

(A. LWOFF e H. DUSI, 1931-34)

Condizione	Nitrati	Sali di ammonio	Asparagina	Asparagina acetato	Seta idrolizzata	Seta acetato	Peptone pancreatico (muscolo)	Peptone pancreatico (muscolo) acetato
Alla luce	+	++	++	++	++	++	++	++
All'oscurità	0	0	0	0	-	++	+	++

La razza intrattenuta in serie in peptone di seta non dà che un numero di flagellati scarsissimo (0,1 per mm.³). L'aggiunta di acetato sodico porta lo sviluppo a 300 flagellati per mm.³. Analoghi risultati furono ottenuti con peptone pancreatico di carne al quale l'aggiunta di acetato è necessaria per ottenere una coltura abbondante. Altre specie di clorofiti sono state studiate con l'intento di compararle ai Leucofiti privandole

della funzione clorofilliana con una lunga permanenza al buio. Sono *Chlamydomonas agloëformis* e *Haematococcus pluvialis* (A. e M. LWOFF, 1929), *Chlamydomonas pseudagloë, monoica, dorsoventralis subglobosa, pulchra* (LUCKSCH, 1932), *Chlorogonium euchlorum e elongatum* (LOEFER, 1934, E. G. PRINGSHEIM, 1934-35, A. LWOFF e H. DUSI, 1935). Tutti si sono mostrati capaci di vivere all'oscurità e hanno sostituito l'amilogenesi che alla luce avveniva con l'aiuto della funzione clorofilliana, con una sintesi dell'amido a partire da un alimento carbonato organico indipendente. Per tutti questi organismi è quindi necessaria la presenza di un alimento carbonato organico (acido acetico e acidi grassi inferiori) indipendente e sono tutti oxirofi in assenza della funzione clorofilliana. Il grande potere di un largo numero di specie, naturalmente provviste di clorofilla di sostituire l'acido acetico nella sintesi dell'amido alla fotosintesi, ha fatto avanzare ad A. LWOFF (come è detto più sopra) l'ipotesi di lavoro che tale acido grasso possa essere una delle tappe del processo fotosintetico clorofilliano. Altri Autori studiarono i clorofiti per determinare il massimo potere di sintesi, e tali ricerche, essendo i clorofiti naturalmente provvisti di clorofilla, furono fatte alla luce. La prima coltura pura di *Euglena gracilis* rimonta al 1899 con ZUMSTEIN. Le ricerche furono poi riprese da TERNETZ e da E. G. PRINGSHEIM, 1912, F. MAINX, 1924-28 ed infine da H. DUSI, 1929-33.

Riporto i risultati di H. DUSI come i più accurati e recenti. H. DUSI studia comparativamente il potere di sintesi di 7 Euglene ben distinte morfologicamente ed egli pure arriva alla conclusione che ciascuna specie morfologica possiede caratteristiche fisiologiche specifiche. L'influenza del pH, del mezzo di coltura è molto grande su certe specie di *Euglena*. Infatti, nel caso di *Euglena stellata*, la zona di coltura rigogliosa è molto ristretta (fra pH = 5,3 e pH = 5,7). Altre, come *Euglena Klebsii* e *deses* hanno una zona *optimum*, che comprende un'intera unità di pH, rispettivamente fra pH = 6 e pH = 7 per *Klebsii* e fra pH = 6,5 — 7,5 per *deses*. Altre infine hanno una più larga zona di sviluppo *optimum*, come *Euglena anabaena* fra pH = 6 e pH = 8, *Euglena pisciformis* fra pH 6,5 - 8,5, e infine *Euglena gracilis* ha una zona *optimum* di sviluppo realmente sorprendente, potendo svilupparsi bene da pH = 3, a pH = 8,5.

La nutrizione carbonata delle Euglene e dei flagellati verdi alla luce è del tutto uguale a quella delle piante superiori: la sintesi dell'amido è realizzata a partire dal CO₂ atmosferico con l'aiuto della funzione clorofilliana. Lo studio della nutrizione azotata delle varie Euglene ha portato H. DUSI a delle conclusioni interessanti, e cioè che non tutti gli organismi a clorofilla sono *fotoautotrofi*. Sono i risultati di H. DUSI che hanno consigliato ad A. LWOFF di creare il gruppo fisiologico dei *fototrofi* (gruppo di organismi che assimilano il CO₂ atmosferico con la fotosin-

tesi), in cui è considerato solo il potere di sintesi delle sostanze carbonatate degli organismi a clorofilla.

Il termine comunemente usato in fisiologia vegetale di *autotrofia* è sostituito dal termine *fotoautotrofia*, che spiega meglio come avvenga la sintesi delle sostanze carbonatate. Ciò non solo per distinguere dagli organismi fotoautotrofi che assimilano l'azoto minerale da quelli che richiedono forme più complesse d'azoto (*fotomesotrofi* e *fotometatrofi*) pur essendo provvisti di clorofilla e assimilanti il CO₂ atmosferico per la sintesi delle sostanze carbonatate, ma anche per separare un altro gruppo di organismi (batteri nitrificanti) che si nutrono come gli autotrofi della definizione di PFEFFER di composti azotati e carbonati minerali, ma assimilano però il CO₂ ossidando composti inorganici: *Chemiotrofi*.

Ora tale fotoautotrofia era ammessa da tutti, come risultato fondamentale tratto dallo studio sull'alimentazione delle piante superiori.

Lo stesso MAINX, che prima di H. DUSI sperimentò sulle stesse specie di Euglene, cadde in questo errore, concludendo che le Euglene sono esseri autotrofi alla luce. Ma il metodo di ricerca che egli adoperò non era probabilmente così accurato e non si sa se abbia compiuto semine in serie nello stesso mezzo di coltura.

Specialmente nelle ricerche con gli organismi autotrofi è necessaria una scrupolosità di sperimentazione che a prima vista sembrerebbe esagerata, se poi non ci si dovesse accorgere quale importanza la mancanza di rigidità abbia sulla sperimentazione. Occorre assolutamente per tali ricerche adoperare vetreria neutra, lavata chimicamente alla miscela sulfo-cromica e poi all'acido nitrico, occorre costituire i propri liquidi colturali con sali assolutamente puri, adoperando solamente acqua bidistillata. Bisogna inoltre che nel mezzo di coltura in esperimento siano fatti almeno cinque passaggi, seminando ogni volta con una goccia sola se si vuol essere sicuri che non si sono portate sostanze nutritive con la prima goccia di semina.

Dalle tabelle seguenti si può rilevare che anche nelle Euglene esistono caratteri fisiologici diversi per ciascuna delle specie studiate. Queste differenze sono nell'utilizzazione dei nitrati o sali d'ammonio o di gruppi differenti di amminoacidi o nella non utilizzazione di tali sostanze.

Nutrizione azotata alla luce
(H. DUSI, 1933-37)

Specie	Nitrati	Sali di ammonio	Acidi aminici	Peptoni
<i>Euglena gracilis</i>	+	++	++	++
<i>Euglena stellata</i>	+	+	++	++
<i>Euglena Klebsii</i>	+	+	++	++
<i>Euglena anabaena</i>	0	0	++	++
<i>Euglena deses</i>	0	0	++	++
<i>Euglena pisciformis</i> . .	0	0	0	++
<i>Euglena viridis</i>	0	0		++

Valore nutritivo di vari aminoacidi
(H. DUSI, 1933)

Aminoacidi	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Euglena stellata</i>	<i>Euglena Klebsii</i>	<i>Euglena anabaena</i>	<i>Euglena deses</i>	<i>Euglena pisciformis</i>
Glicocolla	+	+	+	+	0	0
D Alanina	++	++	++	+	++	0
DL Valina	++	+	+	+	0	0
L Leucina	++	++	++	+	++	0
DL Serina	+	++	+	0	+	0
DL Fenilalanina	++	+	0	++	0	0
Istidina monoclorig.	++	++	++	0		0
D Arginina (base)	0	+	0	0		0
D Lisina (monoclorig.)	0	++	++	0	++	0
DL Prolina	+	++	++	+	++	0
Ac. glutammico D	+	+	+	0	++	0
Ac. aspartico L	+	+	0	+	++	0
Asparagina	++	++	++	++	++	0

Le sette specie studiate si possono catalogare in tre tipi differenti: *Euglena gracilis*, *stellata*, *Klebsii*, sono *fotoautotrofe*, come la maggior parte delle specie a clorofilla, cioè possono utilizzare composti azotati e carbonati minerali.

Euglena deses e *anabaena* sono *fotomesotrofe*, poichè, come i mesotrofi, hanno bisogno di un alimento organico semplice (aminoacido) e come i fototrofi assimilano il CO² atmosferico con la fotosintesi clorofilliana.

Euglena pisciformis e *Euglena viridis* infine hanno bisogno di sostanze organiche complesse (peptone) come i metatrofi e sono quindi *fotometatrofe*.

Recentemente HUTNER (1936) studiò le due specie *Euglena gracilis* ed *E. anabaena*, e concluse che non sono fotoautotrofe. H. DUSI (1936-37), continuando e controllando le proprie esperienze, conclude che, contrariamente ai risultati del 1933, *E. anabaena* è fotomesotrofa, mentre *E. gracilis* è veramente fotoautotrofa.

Da questi risultati sorge naturale la conclusione che anche negli organismi possedenti la funzione clorofilliana può esistere una dissociazione fra i poteri di sintesi della nutrizione carbonata e della nutrizione azotata.

Ciò anche se è ben dimostrato che la riduzione dei nitrati è legata alla presenza della clorofilla, e che la funzione clorofilliana con la sua sintesi di corpi carbonati organici influisce indirettamente sulla sintesi delle sostanze organiche azotate fornendo i radicali in cui verrà poi attaccato l'NH² proveniente dalla riduzione dei nitrati o dall'ossidazione di composti ammoniacali.

Gli esempi di una maggior perdita di funzione come *Euglena deses*, *anabaena*, *viridis* e *pisciformis* dimostrano che il potere di sintesi azotata e la funzione clorofilliana possono essere due variabili indipendenti e che non sempre la presenza dell'assimilazione clorofilliana causa obbligatoriamente l'utilizzazione dei nitrati, sali d'ammonio o aminoacidi come unici alimenti azotati.

H. DUSI ha pure osservato che solo *Euglena gracilis* può crescere in assenza di luce, mentre la luce è indispensabile a *Euglena stellata*, *Klebsii*, *anabaena*, *deses* e *pisciformis*. Quindi certe specie di Euglene sono obbligatoriamente fototrofe e solo le altre, che possiedono una clorofilla particolarmente labile e per le quali la fototrofia non è obbligatoria, ma può essere sostituita nella sua funzione energetica da alimenti carbonati organici (acidi grassi), potranno essere state le specie capostipite delle forme definitivamente decolorate che si ritrovano in natura. Dopo il lavoro di H. DUSI furono ottenute due Astasie (forme leucofite naturali corrispondenti ai clorofiti *Euglenidae*) in cultura pura: *Astasia Chattoni* (LWOFF, 1934) e *Astasia ocellata* (PROVASOLI inedito, 1937). Ambedue sono oxi-

trofe e possiedono alte analogie con *Euglena gracilis* nella nutrizione carbonata.

Un'altra interessante corrente di ricerche si inizia con la soppressione sperimentale dei cloroplasti realizzata in *Euglena Mesnili* da A. LWOFF e H. DUSI (1935). Dopo le osservazioni di SCHERFFEL, DOFLEIN e PASCHER, si sa che in natura può aver luogo la trasformazione di Clorofiti in Protozoi. Infatti alcune *Chrysomonadinae* che hanno un solo plasto, quando la velocità di scissione del plasto è in ritardo sulla velocità di scissione plasmatica, possono dar luogo a due organismi figli, di cui uno porta con sé il plasto che non fece tempo a dividersi e l'altro ne rimane sprovvisto. *Euglena Mesnili* dimostra d'avere una particolarità fisiologica analoga se è coltivata all'oscurità in un mezzo ricco di sostanze organiche. La velocità di divisione del cloroplasto è inferiore a quella dell'intero individuo. Alla luce un individuo di *Euglena Mesnili* contiene circa 100 cloroplasti, dopo sei mesi di coltura al buio il numero dei plasti è ridotto a 15-20, a 13 mesi si osservano circa 6 cloroplasti per individuo. Dopo 15 mesi all'oscurità la gran maggioranza delle Euglene possiede due plasti di un verde pallido (i plasti rimangono funzionanti poichè anche nelle Euglene che contengono un solo plasto si trovano alcuni granuli di paramilo). Ma vi sono anche alcuni individui che sono completamente privi di cloroplasto e di paramilo, pur rimanendo normali in grandezza e movimento. L'isolamento di un flagellato senza plasto darà un ceppo definitivamente sprovvisto di cloroplasti e clorofilla e realizzerà sperimentalmente il passaggio Clorofita - Protozoo.

Protozoi e Fagotrofi obbligatori

Quasi tutti i Flagellati clorofiti e leucofiti hanno una nutrizione diffusiva, cioè mancando di una citofaringe assorbono direttamente attraverso la membrana del corpo dal mezzo di coltura le sostanze nutritive. Questo è il caso degli organismi che abbiamo passato in rassegna prima (eccezion fatta per *Chilomonas paramoecium*, che possiede una citofaringe e che in natura si nutre di particelle solide). Al di fuori dei flagellati gli altri Protisti Eucarioti si nutrono in natura di particelle solide di materiali organici o di Bacteri od altri Protisti, sono cioè *fagotrofi*. Tipici in questa forma di nutrizione sono tutti i Ciliati e le Amebe.

Interessante in proposito la monografia di SANDON che ha raccolto in un'ampia bibliografia tutti i dati conosciuti sulla nutrizione in natura dei Protisti. Ma con le colture pure finora realizzate di alcune Amebe e Ciliati si è potuto vedere che se la maggioranza dei Protozoi propriamente detta è fagotrofa obbligatoria, alcuni però hanno il potere di ser-

virsi di un sistema diffusivo di nutrizione. A questa categoria appartengono alcune Amebe e Ciliati. Fu A. LWOFF (1923-32) a realizzare per primo in un mezzo completamente liquido la coltura di un Ciliato *Glaucoma pyriformis*. Questa specie può essere coltivata in un mezzo formato da pezzi d'organo (cervello, fegato e rene) immersi in acqua e sterilizzati; in tale mezzo la riproduzione è abbondante e dura a lungo. Però l'Autore potè ottenere buone colture in altri mezzi completamente liquidi e più semplici, come autolisati di lievito e peptone. Occorrono però dei peptoni che abbiano subito una idrolisi peptica o pancreatica. Peptoni più fortemente idrolizzati come l'ereptone e il peptone di seta non permettono alcuna coltura. Sembra dunque, allo stato attuale delle ricerche che *Glaucoma pyriformis* non possa utilizzare aminoacidi semplici, ma abbia bisogno di peptidi complessi. Il mezzo in cui *Glaucoma pyriformis* può svilupparsi e riprodursi abbondantemente e in cui realizza la sintesi massima, è a base di peptone pancreatico di muscolo (10 per mille) e Na Cl (4 per mille). Ad analoghe conclusioni giunsero HETHERINGTON per *Colpidium campylum* e *Loxoecephalus granulatus* (1933), R. CAILLEAU con *Acanthamoeba Castellanii* (1933-34) ed ELLIOT con *Colpidium campylum* e *Colpidium striatum* (1933-35). La conclusione di LWOFF sull'esistenza di un possibile gruppo di Protozoi non fagotrofi obbligatori è stata dunque provata ed allargata dalle recenti colture pure di altri Ciliati e perfino di Amebe (che erano ritenute essere tipicamente fagotrofe).

Altri Protisti richiedono assolutamente un alimento figurato e non si è potuto finora intrattenerli in mezzi completamente liquidi. A questa seconda categoria appartengono *Colpoda Steini* (OEHLER, 1915), *Hartmannella aquarum*, *Wahlkampfia magna* (OEHLER, 1916), *Colpoda cucullus* (OEHLER, 1919) e *Glaucoma scintillans* (CHATTON E. e CHATTON M., 1925). Tutti questi Protisti si sono potuti coltivare in un mezzo peptonato più corpi di batteri o lieviti uccisi col calore o con agenti chimici (culture letobatteriche).

Vi è infine una terza categoria che richiede in più di una parte nutrizia liquida più o meno complessa (peptoni - estratti di organi) e di un alimento figurato (corpi di batteri o lieviti), altre sostanze di cui non conosciamo la composizione. Certamente però uno dei fattori necessari contenuti in queste sostanze è termolabile.

Infatti la coltura di *Paramoecium caudatum* (GLASER, 1935) non può essere ottenuta se non vi è presente in più dell'estratto di fegato e dei corpi uccisi di lieviti, dei pezzetti di rene fresco di coniglio prelevati asetticamente. Dunque *Paramoecium caudatum* richiede una o più sostanze termolabili contenute nel rene fresco. *Paramoecium multinucleatum* (GLASER, 1935) richiede un'alimentazione simile e complessa.

Pure *Kahlia acrobates* (PROVASOLI, 1935) sembra abbisognare di una sostanza altamente termolabile. Infatti questo Ipotrico cresce bene alimentandosi di *Polytoma uvella* vivi; tentativi fatti per alimentarlo con *Polytoma uvella* uccisi col calore hanno dimostrato che solo 9 minuti a + 44°C. (tempo minimo necessario a tale temperatura per uccidere *Polytoma uvella*) sono stati sufficienti per rendere l'alimento inusufruibile.

Tale bassa temperatura e un così corto tempo non possono avere modificato a tal punto le proteine da renderle inusufruibili e sembrerebbe più giusto arguire che in *Polytoma uvella* è contenuta una o più sostanze estremamente termolabili di composizione sconosciuta e indispensabili a *Kahlia acrobates*. Dunque, riassumendo, i Ciliati e le Amebe possono distinguersi in due grandi gruppi fisiologici: quelli che possono usufruire delle sostanze nutritizie allo stato di soluzione e i fagotrofi obbligatori. I fagotrofi sono un materiale prezioso di studio per la ricerca di sconosciuti fattori di crescita che potrebbero dimostrarsi indispensabili anche per altri organismi più altamente organizzati.

Protozoi parassiti

1) Trypanosomidae

Le colture di Tripanosomidi sono state realizzate su larga scala fin dal principio del secolo XX. A quei tempi infatti era necessario studiare a fondo la morfologia e la patogenicità di questo gruppo di Protozoi, in cui sono compresi parassiti dell'uomo e degli animali. Naturalmente, data l'urgenza dei problemi biologici interessanti la medicina, si realizzarono dei mezzi di coltura molto complessi e atti a dare sempre un sicuro risultato di rapida ed abbondante crescita per poter controllare della reale loro patogenicità e per poter trovare dei metodi di lotta contro le epizoozie provocate da essi.

G. ZOTTA ricerca per primo in *Leptomonas pyrrocoris* i fattori indispensabili alla nutrizione di questo flagellato parassita dell'emittero *Pyrrocoris apterus*. La questione delle colture dei Tripanosomidi non è trattata da lui sotto il punto di vista pratico della realizzazione della coltura pura (come era stato fatto dai primi ricercatori) ma invece spinge le sue ricerche nel campo biochimico della nutrizione. Egli seppe mettere in luce i due fattori necessari alla moltiplicazione di *Leptomonas pyrrocoris*: il mezzo nutritizio propriamente detto (brodo di carne peptonato) e una sostanza contenuta nel sangue, negli organi, nella catalasi del fegato di vitello, sostanza che agisce in piccola dose (dose minima di sangue 1/500, dose minima di catalasi 1/43.000) e che non è distrutta dalla sterilizzazione in autoclave a 120°. M. LWOFF (1928-33) riprende

ed estende le ricerche sui Tripanosomidi studiando in coltura pura *Leptomonas ctenocephali*, *Strigomonas oncopelti*, *Strigomonas fasciculata*. Riesce a determinare che la sostanza attiva e necessaria contenuta nel sangue è l'emateina e che nella catalasi e nelle perossidasi vegetali, pure attive, è un complesso porfirina-ferro. Le ricerche vennero poi estese a numerose altre specie con accurate e precise ricerche. La parte molto interessante è che alcuni di questi Protozoi parassiti di insetti sono capaci ancora della sintesi dell'emina e che possono crescere abbondantemente, come *Glaucoma pyriformis* e altri Protozoi liberi, in un mezzo contenente polipeptidi (peptone pancreatico di muscolo, pepsico di muscolo, e pepsico di arachide) e quindi non differiscono nella nutrizione, dai Protozoi liberi. A questi gruppi di Tripanosomidi *aplotrofi* appartengono:

Strigomonas parva (parassita di una *Calliphora* sp.) (M. LWOFF, 1936);

Strigomonas media (parassita di una *Calliphora* sp.) (M. LWOFF, 1936);

Strigomonas culicidarum var. *culicis* (parassita di una larva di *Culex pipiens*) (M. LWOFF, 1935);

Strigomonas oncopelti (parassita delle *Asclepiadeae* e dell'emittero *Oncopeltus fasciatus*) (M. LWOFF, 1933).

Altri Tripanosomidi hanno perso il potere di sintetizzare l'emina, ed a loro è indispensabile, oltre al peptone (v. sopra) l'emina o il sangue in quantità variabile. Quindi anche nei Tripanosomidi si è potuto mettere in luce, mercè le colture pure, una perdita nel potere di sintesi e una regressione fisiologica dovuta al parassitismo. I Tripanosomidi seguenti sono da considerarsi per le loro richieste metaboliche come organismi *paraemotrofi*.

Leptomonas pyrrocoris (parassita dell'emittero *Pirrhocoris apterus*) (G. ZOTTA, 1923);

Leptomonas ctenocephali (parassita di un adulto di *Ctenocephalus canis*) (M. LWOFF, 1933);

Strigomonas fasciculata (parassita di un adulto di *Culex pipiens*) (M. LWOFF, 1933);

Strigomonas muscidarum (parassita di un adulto di *Musca domestica*) (M. LWOFF, 1936);

Strigomonas culicidarum var. *anophelis* (parassita di un adulto di *Anopheles quadrinucleatus*) (M. LWOFF, 1935).

Ma se tutti questi organismi richiedono sangue o emina (sostanza attiva del sangue per questi Tripanosomidi), la quantità necessaria per ottenere una buona coltura varia da specie a specie.

Specie	Quantità minima di sangue emolizzato
<i>Leptomonas ctenocephali</i>	1/500
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	1/5.000
<i>Strigomonas muscidarum</i>	1/200.000
<i>Strigomonas fasciculata</i>	1/300.000
<i>Strigomonas culicidarum</i> var. <i>anophelis</i>	1/2.000.000 - 1/5.000.000

M. LWOFF riuscì anche a determinare sperimentando con un largo numero di sostanze quale era la sostanza di costituzione chimica definita che permetteva la sintesi massima. Il sangue emolizzato può essere sostituito dalla emina, dalla protoemina, dalla protoporfirina. Sono al contrario senza azione sulla crescita di questi Tripanosomidi la deuterioemina, mesoemina, feoforbide b-emina, ematoporfirina, mesoporfirina, citocromo C, e l'emocianina. Il ferro attivo di Baudisch e la perossidasi di WOLFF, anche stabilizzata da un colloide protettore, sono inattive.

A. LWOFF (1933-34) studia la respirazione di parecchie specie, e precisamente di *Strigomonas oncopelti*, *fasciculata*, e *Leptomonas ctenocephali* col metodo di Barcroft-Warbourg e vede che l'emina e le sostanze attive simili agiscono non come nutrimento, ma come promotori della respirazione di questi flagellati parassiti. Egli dà le cifre della respirazione, della glicolisi aerobica e anaerobica, rapportandole al peso secco dei flagellati. Dalle ricerche di A. LWOFF si sa che la moltiplicazione di *Strigomonas fasciculata* è proporzionale alla quantità di sangue fornito. Eseguendo dei calcoli stechiometrici e rapportandoli al peso secco dei Protozoi, A. LWOFF trova che sono necessarie 746.000 molecole di emina ad un flagellato per dividersi. Mediante il metodo manometrico di Barcroft-Warbourg, l'Autore osserva che il Q_{O_2} (consumazione di ossigeno in mm.³ per mgr. di flagellati (peso secco) per ora) è di 55. Quando la moltiplicazione è arrestata per mancanza di sangue, il Q_{O_2} è di 22. Si può ottenere un aumento di respirazione solamente fornendo emina ai flagellati, e l'aumento di respirazione si produce con velocità costante ed è proporzionale alla quantità minima fornita (1×10^{-6} gr. di sangue e i suoi derivati (protoemina e protoporfirina) entra dunque nella costituzione di un sistema catalitico respiratorio (1 gr. atomo di ferro di questo sistema trasporta a + 28°C. 4,83 mol./gr. di ossigeno al secondo). L'aggiungimento dell'ematina, protoemina (oppure della protoporfirina, a cui il flagellato può saldare il ferro) è specifica, poichè la mesoporfirina, rodina, feoforbide-a, pirroporfirina, mesoemina, feoforbide-a-emina, feoforbide-b-emina, piroemina, citocromo C, ematoporfirina, deuterioemina IX, deuteroporfirina IX sono senza azione. La quantità di sangue richiesta da ciascuna di queste specie è un carattere prezioso di differenziazione che

può essere di aiuto alla classificazione dei Tripanosomidi. Ne è un esempio la differenziazione in due varietà che M. LWOFF (1935) ha fatto della specie *Strigomonas culicidarum*. Si tratta di due ceppi provenienti uno da una larva di *Culex pipiens*, e l'altro da un adulto di *Anopheles quadrimaculatus*. I due ceppi non hanno particolarità morfologiche tali da poter essere differenziati. Il potere fermentativo dei due ceppi verso un gruppo di zuccheri è uguale. Perfino le prove di agglutinazione e di deviazione del complemento (prove che in generale sono sensibilissime) non mostrano alcuna differenza. Lo studio fisiologico del potere di sintesi diede al contrario una differenza veramente notevole. Un ceppo, quello proveniente da larva di *Culex pipiens* si è mostrato capace di svilupparsi per 48 passaggi in peptone pepsico di arachide. Mentre l'altro ceppo proveniente da un adulto di *Anopheles quadrimaculatus* non è capace di realizzare la sintesi della protoporfirina e non fu possibile coltivarlo che in presenza di sangue emolizzato di coniglio a 1/2.000.000 - 1/5.000.000. Perciò la specie *Strigomonas culicidarum* è fisiologicamente dissociata in due varietà *Culicis* ed *Anophelis*, a cui corrispondono due poteri di sintesi ben distinti. Si sono potute trovare dunque anche nei Flagellati parassiti due varietà a potere di sintesi differente che mostrano quale degradazione fisiologica avvenga col parassitismo. Degradazione fisiologica in questo caso consiste nella perdita di una funzione: la sintesi dell'emina (bisogno di una sostanza che promuova la respirazione).

Nei batteri paraemotrofi RIVERS e FILDERS trovano un caso simile di dissociazione fisiologica di una stessa specie in due varietà. Gli Autori hanno potuto mettere in evidenza nel bacillo di PFEIFFER due varietà di cui una sintetizza l'emina: *Hemophilus parainfluenzae* e l'altra ne ha perso il potere: *Hemophilus influenzae*.

2) *Trichomonas*

Pochi sono finora i *Trichomonas* ottenuti in coltura pura:

Trichomonas colubrorum (parassita della *Tarentola mauritanica*) (E. CHATTON, 1918);

Trichomonas foetus (ottenuto da una vacca affetta da piometria) (G. WITTE, 1933);

Trichomonas columbae (agente della Trichomoniasi dei colombi) (A. Bos, 1933).

I liquidi nutritizi per i *Trichomonas* sono molto complessi, però i ricercatori soprannominati cercarono di semplificarli il più possibile. Recentemente R. CAILLEAU, lavorando su queste tre specie, estende e riverifica i risultati ottenuti da CHATTON, BOS e WITTE.

	Mezzi di coltura			Temperatura			
	Brodo sangue	Brodo + fegato	Siero coagulato + brodo + siero	20°	28°	32°	37°
<i>Trichomonas colubrorum</i>	+ (1) (3)	+ (1) (3)	+ (3)	+ (1)	+ (3)	+ (3)	+ (1)
<i>Trichomonas foetus</i>	+ (2)	O (2) (3)	+ (3)	O (2)	+ (3)	+ (3)	+ (2) (3)
<i>Trichomonas columbae</i>	O (4)	+ (3) (4)	O (3)	O	O (3)	+ (3)	+ (4)

(1) Risultati di E. CHATTON, 1918; (2) Risultati di WITTE, 1933; (3) Risultati di CAILLEAU, 1934-35; (4) Risultati di Bos, 1933.

Come si può notare, esistono differenze tra le tre specie studiate sia per l'utilizzazione diversa di vari mezzi di coltura adoperati che per la resistenza a temperature varie. L'utilizzazione di glucidi di queste tre specie (R. CAILLEAU, 1934-36) presenta inoltre altri caratteri differenziali.

Glucidi	<i>T. Foetus</i>	<i>T. columbae</i>	<i>T. colubrorum</i>
Arabinosio	O	O	O
Xilosio	O	O	O
Ramnosio	O	O	O
Glucosio	++	++	++
Galattosio	++	++	++
Lattosio	++	+	+
Levulosio	++	+	++
Maltosio	++	++	++
Saccarosio	++	++	++
Raffinosio	++	O	++
Inulina	+	+	O
Destrina	++	++	O
Glicerina	O	O	O
Eritrite	O	O	O
Sorbite	O	O	O
Dulcite	O	O	O
Mannite	O	O	O

O = nessuna acidificazione
 + = leggera »
 ++ = forte »

Un passo avanti nella semplificazione del mezzo nutritizio e nella ricerca delle sostanze necessarie alla nutrizione dei *Trichomonas* è fatto da R. CAILLEAU con le sue ricerche sulla nutrizione di *Trichomonas columbae* (1935-36). *Trichomonas columbae* cresce bene in un mezzo composto di brodo di carne + pezzetti di fegato (sterilizzazione a + 120° C. per mezz'ora).

Mantenendo come base del liquido nutritizio il brodo di carne R. CAILLEAU tenta di sostituire al fegato i suoi estratti acquosi alcoolici, eteri e acetici, ma senza risultato. Prova allora, in aggiunta sempre al brodo, i residui di fegato dopo le varie estrazioni: i residui di fegato delle estrazioni acquose, alcooliche, eteri danno buone colture, il residuo dell'estrazione acetica non permette alcun sviluppo. L'aggiunta al mezzo: brodo di carne + residuo di fegato dopo l'estrazione acetica (negativo), dell'estratto acetico di fegato (negativo) dà buone colture. L'estrazione acetica deve dunque aver sciolto una sostanza che da sola in aggiunta al brodo di carne è senza azione (brodo di carne + estratto acetico di fegato = negativo), ma che aggiunta al residuo acetico di fegato permette di nuovo la crescita. La determinazione di tale sostanza è fatta da R. CAILLEAU, tenendo come mezzo di base il liquido nutritizio brodo + residuo di fegato dopo estrazione acetica e aggiungendo altre sostanze. Il giallo d'uovo, la lecitina idrolizzata, bile, e colesterina possono sostituire l'estratto acetico di fegato e permettono la crescita di *Trichomonas columbae*. La colesterina, sostanza solubile in acetone, è presente sia nel giallo d'uovo che nella lecitina, bile e fegato, ed è un fattore indispensabile per la crescita di *Trichomonas columbae*.

I risultati ottenuti con la colesterina vennero ricontrollati con un campione purissimo di colesterina (crescita abbondante). Altri steroli vennero sperimentati dall'Autrice per vedere quale era la parte essenziale della complessa struttura chimica della colesterina.

Delle sostanze sperimentate solo il diidrocolesterolo, l'acetato di colesterolo, ergosterolo, sitosterolo e cincolo sono attivi e possono sostituire la colesterina nella sua funzione di fattore di crescita. Il colestano, epicolestanolo, transdeidroandrosterone, androstene-diol, testosterone follicolico, equilina, equilenina, acido Δ 5-6-3 oxicolenico, sono inattivi. Sembra quindi giusta la conclusione di R. CAILLEAU che alcune modificazioni nella parte ciclica o nella catena laterale sono compatibili con l'attività degli steroli come fattori di crescita per *Trichomonas columbae*.

Conclusioni

I risultati ottenuti finora con lo studio fisiologico in coltura pura di parecchie specie di Protozoi, sono stati qui esposti in paragrafi ognuno dei quali comprende grandi gruppi morfologici ben distinti. I fatti più importanti riguardanti l'evoluzione fisiologica dei Protozoi sono stati messi in luce man mano durante l'esposizione. Non sarà inutile però raggruppare tali dati. Le specie che a tutt'oggi sono state studiate nelle loro esigenze fisiologiche sono poche, ma hanno già servito di base ad una classificazione fisiologica e a confermare alcune delle più interessanti osservazioni morfologiche sull'evoluzione nei Protozoi. DOFLEIN e specialmente PASCHER, dalle loro ricerche conclusero che i Flagellati incolori, ma provvisti di amilogenesi, derivavano filogeneticamente da corrispondenti forme verdi, provviste di cloroplasti. Infatti i Flagellati dei generi: *Chilomonas*, *Polytomella*, *Polytoma*, *Hyalogonium*, *Astasia*, non differiscono dai generi *Cryptomonas*, *Pyramidomonas*, *Chlamydomonas*, *Chlorogonium*, *Euglena*, che per la mancanza del cloroplasto e della clorofilla. Tutti gli altri caratteri morfologici sono identici, e si ritrovano specie incolori del tutto corrispondenti a specie verdi. Con le ricerche citologiche di VOLKONSKY si sa che i Leucofiti hanno un leucoplasto che si ravvicina nella forma al cloroplasto di origine della specie corrispondente verde. I Leucofiti si differenziano dunque dai Clorofiti per la sola perdita della clorofilla. Lo studio di alcuni Clorofiti e Leucofiti ha provato una stretta connessione metabolica tra le forme verdi e bianche e nello stesso tempo un'evoluzione fisiologica consistente in una perdita nel potere di sintesi.

I Clorofiti, come *Euglena gracilis*, privati della funzione clorofilliana, assumono le esigenze fisiologiche tipiche dei Leucofiti: l'oxitrofia. La stretta parentela dei Clorofiti coi Leucofiti è dimostrata da questa identità di comportamento fisiologico. L'assoluto bisogno o l'azione altamente favorevole di una sostanza organica carbonata indipendente è la conseguenza della perdita del potere di sintetizzare la clorofilla o della mancata funzione clorofilliana. L'evoluzione fisiologica è qui data dalla perdita di una funzione e da richieste carbonate più complesse.

L'evoluzione fisiologica del potere di sintesi delle sostanze azotate è una scomparsa graduale di funzioni; dapprima viene perduto il potere di ridurre i nitrati; in seguito il potere di utilizzare i sali d'ammonio come unica fonte azotata, e da ultimo è perduto quello di sintetizzare gli aminoacidi fondamentali alla costituzione delle proteine cellulari.

Considerando i bisogni nutritivi minimi di parecchie specie del genere *Euglena* e *Polytoma*, noi troviamo un esempio di un'evoluzione fi-

siologica nel potere di sintesi delle sostanze azotate, fatto che dimostra che esiste un'evoluzione fisiologica nelle varie specie appartenenti ad uno stesso genere. Nel genere *Euglena* esistono specie che sintetizzano le sostanze proteiche dai nitrati (*Euglena gracilis*), altre da aminoacidi (*E. deses*), altre solo da polipeptidi (*E. pisciformis*). Nel genere *Polytoma*, la specie *Polytoma uvella* usufruisce i sali d'ammonio; le specie *Polytoma caudatum* e *P. dorsoventrale* non sono più capaci di servirsi di composti inorganici di azoto, e per esse anche gli aminoacidi sono insufficienti; la sintesi massima tra queste due specie è realizzata da peptoni fortemente idrolizzati.

Il passaggio Clorofiti-Protozoi, che era stato osservato da SCHERFFEL-DOFLEIN e PASCHER in alcune *Chryomonadinae*, è stato realizzato sperimentalmente ponendo *Euglena Mesnili* in condizioni tali che la velocità di scissione plasmatica era esaltata in rapporto alla velocità di divisione dei plasti, ottenendo così la perdita successiva di tutti i plasti e alla fine un flagellato provvisto di cloroplasti (Protozoo).

I Protozoi propriamente detti (Ciliati ed Amebe) richiedono tutti sostanze proteiche molto complesse (almeno polipeptidi); però mentre alcuni possono nutrirsi diffusivamente (*Glaucoma pyriformis*, *Acanthamoeba Castellanii*), altri hanno bisogno di particelle solide (fagotrofi obbligatori). Fra i fagotrofi si è visto che alcuni hanno bisogno di fattori di crescita ancora non ben determinati.

Anche il parassitismo porta perdite di poteri di sintesi, oppure deficienze funzionali. Nei Tripanosomidi si sono trovate specie che hanno ancora il carattere primitivo, cioè il potere di sintetizzare, come i Protozoi liberi, i propri costituenti citoplasmatici dai polipeptidi (*Strigomonas parva*, *media*, *culicidarum* var. *culicis*, *oncopelti*); ma in altri il parassitismo ha indotto una regressione fisiologica che consiste nella perdita del potere di sintetizzare un composto di ferro a funzione perossidica respiratoria (*Leptomonas pyrrocoris*, *ctenocephali*, *Strigomonas fasciculata*, *muscidarum*, *culicidarum* var. *anophelis*).

Lo studio della fisiologia comparata della nutrizione dei Protozoi, e particolarmente lo studio parallelo dell'evoluzione morfologica e del potere di sintesi condussero A. LwoFF (1932) alla concezione dell'evoluzione fisiologica. Evoluzione fisiologica che è caratterizzata da una diminuzione dei poteri di sintesi. I microbiologi sono arrivati indipendentemente a conclusioni identiche per quanto riguarda i batteri (B. C. J. G. KNIGHT, 1936). Ora si può dire che esiste fra i protozoi in senso lato e i batteri un notevole parallelismo fisiologico.

BIBLIOGRAFIA

- BOS A. 1933 — Ueber Trichomoniasis bei Tauben - Centr. f. Bakter. Bd. 126, p. 550, e Bd. 130, pag. 220.
- CAILLEAU R. 1933 — Culture d'Acanthamoeba Castellanii en milieu liquide - C. R. Soc. Biol., T. 113, p. 990.
- CAILLEAU R. 1933 — Culture d'Acanthamoeba Castellanii sur milieu peptoné. Action sur les glucides - C. R. Soc. Biol., T. 114, p. 474.
- CAILLEAU R. 1934 — Utilisation des milieux liquides pour Acanthamoeba Castellanii - C. R. Soc. Biol., T. 116, p. 721.
- CAILLEAU R. 1934 — Sur les caractères cultureux de Trichomonas columbae et de Trichomonas Foetus - Bull. Soc. Path. Exot. T. 27, p. 943.
- CAILLEAU R. 1935 — La nutrition de Trichomonas columbae en culture - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 853.
- CAILLEAU R. 1936 — Sur les caractères cultureux de Trichomonas colubrorum - C. R. Soc. Biol., T. 121, p. 108.
- CAILLEAU R. 1936 — Le cholesterol facteur de croissance pour le flagellé Trichomonas Columbae - C. R. Soc. Biol. T. 121, pag. 424.
- CAILLEAU R. 1936 — L'activité de quelques stérois envisagés comme facteurs de croissance pour le flagellé Trichomonas Columbae - C. R. Soc. Biol., T. 122, p. 1027.
- CAILLEAU R. 1937 — La culture des Flagellés du genre Trichomonas en présence de divers sérums - C. R. Soc. Biol., T. 124, p. 435.
- CHATTON E. 1918 — La nutrition des flagellés intestinaux du genre Trichomastix en cultures pures. Simplifications rationnelles de la méthode de culture; les tissus coagulés. - C. R. Soc. Biol., T. 81, p. 774.
- CHATTON E. 1918 — Principaux facteurs physiques qui conditionnent la culture pure des flagellés intestinaux du genre Trichomastix - C. R. Soc. Biol., T. 81, p. 714.
- CHATTON E. e CHATTON M. 1925 — L'action des facteurs externes sur la sexualité des Infusoires. Bactéries zygotènes et azygotènes. Zygose bactérienne et zygose saline. - C. R. Soc. Biol., T. 93, p. 675.
- CHATTON E. e CHATTON M. 1929 — Les conditions de la conjugaison du Glaucoma scintillans en culture léthobactériennes. Action directe et spécifique de certains agents zygotènes. - C. R. Ac. Sciences, T. 188, p. 1315.
- CHATTON E. e CHATTON M. 1931 — La conjugaison de Paramoecium caudatum déterminée expérimentellement par modification de la flore bactérienne associée. - C. R. Ac. Sciences, T. 193, p. 206.
- DOFLEIN F. 1916 — Zuckerflagellaten. - Biol. Central., Bd. 36, p. 43.
- DOFLEIN F. e REICHENOW E. 1926 e 1929 — Lehrbuch der Protozoenkunde. - G. Fischer, Jena.
- DUSI H. 1930 — Les limites de la concentration en ions H pour la culture de quelques Euglènes. - C. R. Soc. Biol., T. 104, p. 734.
- DUSI H. 1930 — Les limites de la concentration en ions H pour la culture d'Euglena gracilis. - C. R. Soc. Biol., T. 103, p. 1184.
- DUSI H. 1930 — La nutrition autotrophe d'Euglena gracilis aux dépens de quelques corps azotés inorganiques. - C. R. Soc. Biol., T. 104, p. 662.

- DUSI H. 1931 — *L'assimilation des acides aminés par quelques Eugléniens.* - C. R. Soc. Biol., T. 107, p. 1232.
- DUSI H. 1933 — *Recherches sur la nutrition de quelques Euglénes.* - Ann. Inst. Pasteur, T. 50, p. 550-840.
- DUSI H. 1936 — *Recherches sur la culture et la nutrition d'Euglena Viridis.* - Arch. Zool. Exp. et Gen., T. 78, p. 133.
- ELLIOT A. 1933 — *Isolation of Colpidium striatum bacteriophage cultures and relation of growth to pH of the medium.* - Biol. Bull., Vol. 65, p. 45.
- ELLIOT A. 1935 — *Effects of carbohydrates on growth of Colpidium.* - Arch. fur Protist., Bd. 84, p. 156.
- ELLIOT A. 1935 — *The influence of Pantothenic acid on growth of Protozoa.* - Biol. Bull., Vol. 68, p. 82.
- ELLIOT A. 1935 — *Effects of certain organic acids and Protein derivatives on the growth of Colpidium.* - Arch. fur Protist., Bd. 84, p. 472.
- GLASER e CORIA 1935 — *The culture of Paramoecium caudatum free from living microorganisms.* - Journ. of Parasitology, Vol. 20, p. 33.
- GLASER e CORIA 1935 — *The culture and reactions of Purified Protozoa.* - Americ. Journ. of Hygiene, Vol. 21, p. 111.
- GUILLERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL 1933 — *Traité de Cytologie Végétale.* - Le François Ed.
- HALL R. P. 1932 — *Effects of certain carbohydrates on growth of Euglena anabaena, var. minor in darkness.* - Anat. Rec., Vol. 54, p. 102.
- HETHERINGTON A. 1933 — *The culture of some Holotrichous Ciliates.* - Arch. f. Protist., Bd. 80, p. 255.
- HETHERINGTON A. 1934 — *The pure culture of Paramoecium.* - Science, Vol. 7, p. 413.
- HUTNER S. H. 1936 — *The nutritional requirements of two species of Euglena.* - Arch. f. Protist., Bd. 88, p. 93.
- JAHN L. T. 1929 — *Studies on the physiology of the Euglenoid flagellates. I. The relation of the density of population to the growth rate of Euglena.* - Biol. Bull., Vol. 57, p. 81-107.
- JAHN L. T. 1932 — *The effects of temperature and certain organic acid radicals on Euglena gracilis.* - Collect. Net. Woods Hole, Vol. 7, p. 269.
- KNIGHT B. C. J. G. 1936 — *Bacterial nutrition.* - Medical Research Council Spec. Rep. Ser., N. 210.
- LOEFER J. B. 1931 — *Effects of certain carbohydrates on the growth of Chlorogonium.* - Anat. Rec., Vol. 51, p. 83.
- LOEFER J. B. 1931 — *Effects of hydrogen-ion concentration on growth of Chlorogonium.* - Anat. Rec., Vol. 51, pg. 83.
- LOEFER J. B. 1933 — *The trophic nature of Chlorogonium and Chilomonas.* - Anat. Rec. Abstracts.
- LOEFER J. B. 1935 — *Effects of certain carbohydrates and organic acids on growth of Chlorogonium and Chilomonas.* - Arch. f. Protist., Bd. 84, p. 456.
- LWOFF A. 1923 — *Sur la nutrition des Infusoires.* - C. R. Acad. Sciences, T. 176, p. 928.
- LWOFF A. 1924 — *Le pouvoir de synthèse d'un Protiste hétérotrophe, Glaucoma pyriformis.* - C. R. Soc. Biol., T. 91, p. 344.
- LWOFF A. 1924 — *Infection expérimentale à Glaucoma pyriformis chez Galleria mellonella.* - C. R. Acad. des Sciences, T. 178, p. 1106.
- LWOFF A. 1925 — *Sur la nutrition des Infusoires aux dépens des substances dissoutes.* - C. R. Soc. Biol., T. 93, p. 1272.
- LWOFF A. 1925 — *Influence d'extraits de glandes et d'organes sur la vitesse de multiplication des Infusoires.* - C. R. Soc. Biol., T. 93, p. 1925.

- LWOFF A. 1929 — *La nutrition de Polytoma uvella Ehr. et le pouvoir de synthèse des protistes hétérotrophes. Les protistes mésotrophes.* - C. R. Acad. Sciences, T. 188, p. 114.
- LWOFF A. 1929 — *Milieux de culture et d'entretien pour Glaucoma pyriformis.* - C. R. Soc. Biol., T. 101, p. 635.
- LWOFF A. 1930 — *Le fer, élément indispensable au flagellé Polytoma uvella Ehr.* - C. R. Soc. Biol., T. 104, p. 664.
- LWOFF A. 1931 — *La nutrition carbonée de Polytoma uvella.* - C. R. Soc. Biol., T. 107, p. 1070.
- LWOFF A. 1932 — *Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires.* - Masson & C., Paris.
- LWOFF A. 1933 — *La fonction du sang dans cultures des Trypanosomides.* - C. R. Soc. Biol., T. 113, p. 231.
- LWOFF A. 1934 — *Die Bedeutung des Blutfarbstoffes für die parasitischen Flagellaten.* - Zentr. f. Bacter., Bd. 130, p. 498.
- LWOFF A. 1935 — *L'oxytrophie des organismes oxytrophes.* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 87.
- LWOFF A. 1935 — *La nutrition azotée et carbonée de Polytomella agilis.* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 974.
- LWOFF A. 1936 — *La fonction de la protohème pour les protozoaires et les bactéries parahémotrophes.* - C. R. Soc. Biol., T. 122, p. 1041.
- LWOFF A. 1936 — *Etudes sur les fonctions perdues.* - Annales des Fermentations - T. 2, p. 419.
- LWOFF A. et DUSI H. 1929 — *Le pouvoir de synthèse d'Euglena gracilis cultivée à l'obscurité.* - C. R. Soc. Biol., T. 102, p. 567.
- LWOFF A. et DUSI H. 1931 — *La nutrition azotée et carbonée d'Euglena gracilis en culture pure à l'obscurité.* - C. R. Soc. Biol., T. 107, p. 1068.
- LWOFF A. et DUSI H. 1934 — *L'oxytrophie et la nutrition des flagellés leucophytes.* - Ann. Institut. Pasteur, T. 53, p. 641.
- LWOFF A. et DUSI H. 1935 — *La suppression expérimentale des chloroplastes chez Euglena Mesnili.* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 1092.
- LWOFF A. et DUSI H. 1936 — *La nutrition de l'Euglénien Astartia Chattoni.* - C. R. Acad. des Sciences, T. 202, p. 248.
- LWOFF A. et LEDERER E. 1935 — *Remarques sur l'« extrait de terre » envisagé comme facteur de croissance pour les flagellés.* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 917.
- LWOFF A. et LWOFF M. 1929 — *Le pouvoir de synthèse de Chlamydomonas agloefornis et d'Haematococcus pluvialis en culture pure à l'obscurité.* - C. R. Soc. Biol., T. 102, p. 569.
- LWOFF A. et LWOFF M. 1930 — *Détermination expérimentale de la synthèse massive de pigmente carotinoïde par le flagellé Haematococcus pluvialis.* - C. R. Soc. Biol., T. 105, p. 454.
- LWOFF A. et LWOFF M. 1936 — *Sur la nature du facteur V.* - C. R. Acad. Sciences, T. 203, p. 520.
- LWOFF A. et PROVASOLI L. 1935 — *La nutrition de Polytoma caudatum var. astigmata et la synthèse de l'amidon par les leucophytes.* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 90.
- LWOFF M. 1933 — *Recherches sur la nutrition des Trypanosomides.* - Ann. Institut. Pasteur, T. 51, p. 55.
- LWOFF M. 1933 — *Remarques sur la nutrition des Trypanosomides et des Bactéries parahémotrophes. Le fer actif de Baudisch.* - Ann. Inst. Pasteur, T. 51, p. 707.
- LWOFF M. 1935 — *Le pouvoir de synthèse des Trypanosomides des Culicides.* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 969.
- LWOFF M. 1936 — *Le pouvoir de synthèse des Trypanosomides des Muscides.* - C. R. Soc. Biol., T. 121, p. 419.
- LUCKSCH I. 1932 — *Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Clamydomonadeen.* - Beih. z. Bot. Centr., Bd. 50, p. 64.

- MAINX F. 1928 — *Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleninen. I e II Teil.* Arch. f. Protist., Bd. 60, p. 305 e 355.
- MAST S. O. e PACE D. M. — *Synthesis of protoplasm from inorganic compounds in the colorless animals.* Chilomonas paramoecium - Anat. Rec., Vol. 54, p. 101.
- MAST S. O. e PACE D. M. 1933 — *Synthesis from inorganic compounds of starch, fats, proteins and protoplasma in the colorless animals,* Chilomonas paramoecium - Protoplasma, Vol. 20, p. 326.
- OEHLER R. 1916 — *Amoebenzucht auf reinem Boden* - Arch. f. Protist., Bd. 37, p. 175.
- OEHLER R. 1919 — *Flagellaten und Ciliatenzucht auf reinen Boden* - Arch. f. Protist., Bd. 40, p. 16.
- OEHLER R. 1924 — *Weitere Mitteilungen über gereinigte Amoeben und Ciliatenzucht* - Arch. f. Protist., Bd. 49, p. 112.
- OEHLER R. 1924 — *Gereinigte Zucht von Freilebenden Amoebe, Flagellaten und Ciliaten* - Arch. f. Protist., Bd. 49, p. 287.
- PASCHER A. 1916 — *Zur Auffassung der farblosen Flagellatenreihen* - Ber. Deut. Bot. Ges., Bd. 34, p. 440.
- PASCHER A. 1916 — *Studien über die rhizopodiale Entwicklung der Flagellaten* - Arch. f. Protist., Bd. 36, p. 81.
- PASCHER A. 1917 — *Flagellaten und Rhizopoden in ihrem gegenseitigen Beziehungen* - Arch. f. Protist., Bd. 38, p. 1.
- PASCHER A. 1918 — *Von einer allen Algenreihen gemeinsamen Entwicklungsregel* - Ber. Deut. Bot. Ges., Bd. 36, p. 390.
- PASCHER A. 1930 — *Eine neue stigmatisierte und phototaktische Amoebe* - Biol. Zentr., Bd. 50, p. 1.
- PRINGSHEIM E. G. 1921 — *Zur Physiologie saprophytischen Flagellaten* (Polytoma, A-stasia und Chilomonas) - Beit. z. Allg. Botanik, Bd. 2, p. 88.
- PRINGSHEIM E. G. und MAINX F. 1926 — *Untersuchungen an Polytoma uvella Ehr. insbesondere über Beziehungen zwischen chemotactischen Reizwirkung und chemischer Konstitution* - Planta Arch. f. wiss. Bot. Bd. 1, p. 583.
- PRINGSHEIM E. G. 1934 — *Über oxytrophie bei Chlorogonium Planta.* - Arch. Wissen. Bot., Bd. 22, p. 146.
- PRINGSHEIM E. G. 1935 — *Wuchsstoffe im Erdboden?* - Sond. aus Naturwiss., Jahr. 23, p. 197.
- PRINGSHEIM E. G. 1936 — *Das Rätsel der Erdabkochung* Bei. z. - Bot. Centr., Bd. 55, p. 100.
- PROVASOLI L. 1935 — *La culture pure mixte du cilié hypotriche Kahlia acrobates* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 93.
- SANDON H. 1932 — *The Food of Protozoa* - Egyptian Univ. Publ. Fac. Sci., 1, Cairo.
- TERNETZ C. 1912 — *Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis* - Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 51, p. 435-514.
- VOLKONSKY M. 1930 — *Les constituants cytoplasmiques de Polytoma uvella Ehr. Existence d'un leucoplaste* - C. R. Soc. Biol., T. 105, p. 619.
- VOLKONSKY M. 1930 — *Les substances de réserve figurées de Polytoma uvella Ehr. Étude descriptive et expérimentale* - C. R. Soc. Biol., T. 105, p. 624.
- VOLKONSKY M. 1930 — *Les variations du plaste de Polytoma uvella et son rôle dans l'assimilation azotée* - C. R. Soc. Biol., T. 105, p. 680.
- WITTE G. 1933 — *Beckterienfreie Züchtung von Trichomonaden aus dem Uterus des Rindes in einfachen Nährboden* - Centr. f. Bakt., Bd. 128, p. 188.
- ZOTTA G. 1923 — *Observations sur la biologie du Leptomonas pyrrocoris dans divers milieux de culture* - Ann. Scient. Univ. de Jassy, Vol. 12, p. 35.
- ZUMMSTEIN H. 1899 — *Zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis* - Thèse - Leipzig - Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 34, p. 174.

Contro la Tignola orientale del Pesco (*Cydia molesta*)

CONSIGLI AI FRUTTICULTORI MANTOVANI

Da parecchi anni ha fatto la sua comparsa in Italia questo nuovo nemico della frutticoltura; le sue malefatte si sono venute aggravando di anno in anno, estendendosi la tignola a tutte le regioni italiane ove è sviluppata un'intensa frutticoltura, la quale pertanto si è trovata e si trova a dover fronteggiare una delle più gravi calamità che mai abbia conosciuto.

La natura del nemico da combattere è tale da rendere vana e assurda qualunque lotta fatta per iniziativa sporadica dei singoli agricoltori, giacchè avverrebbe che mentre l'uno assiduamente spende denaro e fatica per distruggere le tignole del suo frutteto, nuove e continue infezioni sopravvengono dal frutteto del suo vicino che non conduce alcuna lotta.

Era dunque precisamente questo il caso previsto dalle nostre leggi per la difesa delle piante coltivate dai loro nemici, e in base a queste leggi furono recentemente costituiti parecchi consorzi per la lotta obbligatoria contro la *Cydia molesta* nelle provincie venete ed emiliane, che erano le regioni più intensamente frutticole e largamente colpite dalla tignola.

Ultimo cronologicamente fu il consorzio per la frutticoltura per la provincia di Mantova, che tenne dietro immediatamente al decreto per la lotta obbligatoria contro la *Cydia molesta* in provincia di Mantova.

Ecco il testo integrale dei due decreti:

Decreto ministeriale 5 marzo 1936-XIV^o, che istituisce il Consorzio per la frutticoltura in provincia di Mantova.

Art. 1^o — È costituito ai sensi ed agli effetti dell'art. 17 della legge 18 giugno 1931, n. 987, il Consorzio obbligatorio di miglioramento ed incremento della frutticoltura nella provincia di Mantova;

Il Consorzio assume la denominazione di Consorzio provinciale per la frutticoltura di Mantova, ha durata illimitata ed ha sede nel capoluogo della provincia.

Art. 2^o — La contribuzione da corrispondersi dai singoli consorziati non potrà essere superiore a L. 0,10 per ogni pianta da frutto in produzione;

Il Prefetto della provincia di Mantova è incaricato della esecuzione del presente decreto, che sarà inserito nel foglio degli Annunzi Legali della provincia.