

LUIGI PROVASOLI

---

# Studi sulla nutrizione dei Protozoi

## Introduzione

In questi ultimi 15 anni è nato e si è sviluppato un nuovo ramo della fisiologia generale: la fisiologia della nutrizione dei Protozoi. Una serie di ricerche vertenti ormai su parecchie specie appartenenti a differenti ordini, ha permesso di poter definire un certo numero di tipi fisiologici. Già nel 1932 basandosi sulla fisiologia delle specie studiate fino allora, A. LWOFF aveva potuto stabilire interessanti relazioni che esistono fra la struttura morfologica di tali tipi e le loro esigenze trofiche. Da allora in poi molti altri Protozoi furono ottenuti e studiati in colture pure, e gli studiosi che se ne occuparono apportarono una massa di documenti nuovi e diedero un appoggio sempre più sicuro alla teoria da LWOFF sviluppata sulla nutrizione dei Protozoi.

Sarebbe opportuno rifare qui la storia dei primi studi fatti sulla nutrizione dei Protozoi, ma esistendo già una larga bibliografia in proposito, rimandiamo alla bella monografia di A. LWOFF sulla nutrizione dei Protozoi (1932) e alla recente nostra messa a punto (PROVASOLI 1937). Ci importa ora di mettere in chiaro su quali basi morfologiche e fisiologiche si appoggiano le conclusioni che hanno permesso a LWOFF di definire i tre importanti tipi fisiologici di Protozoi.

Antecedentemente a LWOFF, CHATTON (1926) divise tutti i microrganismi in *protisti procarioti* e in *protisti eucarioti*.

I *procarioti*, come lo dice il nome, sono protisti (come i batteri e le forme affini) sprovvisti di un nucleo e di mitocondri individualizzati; i *protisti eucarioti* sono quelli che possiedono nucleo e mitocondri ben individualizzati (questa definizione esclude le *Cianoficee*).

LWOFF (1932) accettando questa prima divisione dei protisti ha ulteriormente distinto i *protisti eucarioti* in tre tipi principali. Tale divisione è basata su osservazioni morfologiche e fisiologiche ad un tempo: essa non ha la pretesa di stabilire delle serie naturali di organismi ma piuttosto quella di poter praticamente chiamare con un nome solo e

comprensivo forme aventi caratteri comuni che presentano un comportamento fisiologico comune e speciale.

LWOFF ha proposto di chiamare col nome di *Clorofiti tutti i protisti che possiedono uno o più plasti e clorofilla*. In questo gruppo rientra un'enorme quantità di specie, ascritte per altri caratteri a differenti ordini e classi, aventi però tutte uno stesso particolare sistema di nutrizione legato ai caratteri morfologici che esse hanno in comune (presenza di plasti e clorofilla).

Saranno dunque ad esempio, Clorofiti: le *Euglene*, i *Chlorogonium*, i *Chlamydomonas* e gli *Haematococcus*. Questa categoria di organismi rientra naturalmente nel regno vegetale. D'altra parte esiste un numero enorme di protisti eucarioti che sono *sprovvisi di plasti e clorofilla*, LWOFF propone di chiamarli *Protozoi sensu stricto* o semplicemente *Protozoi*. In questo gruppo sono compresi dei flagellati come *Bodo*, *Oxyrrhis*, *Leptomonas* e *Trichomonas*; ciliati come *Glaucoma*, *Colpidium*, *Paramecium*; rizopodi come *Amoeba*, *Acanthamoeba*. Questa seconda categoria appartiene indubbiamente al regno animale. Esiste però un terzo gruppo di *protisti eucarioti*, che ci interesserà maggiormente nel presente lavoro, e che comprende *organismi aventi uno o più plasti, ma sprovvisti di clorofilla, o di analoghi pigmenti assimilatorii*. LWOFF ha proposto di chiamare tali organismi *Leucofiti*. Quest'ultimo gruppo comprende forme come *Chilomonas*, *Astasia*, *Polytoma*, *Hyalogonium*, *Polytomella*, provenienti, per perdita di funzione da tutti gli ordini componenti il tipo Clorofiti.

Si sa infatti, dopo le ricerche classiche di DOFLEIN, SCHERFFEL e specialmente di PASCHER, che esistono in tutti gli ordini dei Clorofiti, comprendenti in predominanza forme a clorofilla, delle specie e delle varietà incolori che per la loro forma, la loro struttura, la loro organizzazione ed il loro ciclo evolutivo, sono identiche alle forme colorate. Dunque in realtà queste forme non differiscono dalle forme verdi che per l'assenza del pigmento assimilatore ed è ammesso universalmente che esse derivano per perdita di funzione dalle specie colorate (evoluzione dei clorofiti in leucofiti).

Esistono d'altra parte, come ha dimostrato PASCHER nei suoi brillantissimi studi sulle Crisomonadine, delle forme sprovviste non solo di pigmento ma anche di plasti, che corrispondono a forme possedenti plasto e pigmento assimilatore, fatto che comprova le derivazione diretta dei Protozoi (nel senso definito da LWOFF) dai Clorofiti. Da ciò si può dedurre che l'evoluzione dei protisti eucarioti può seguire due schemi differenti: clorofiti - leucofiti - protozoi, oppure direttamente, come nel caso delle Crisomonadine: clorofiti - protozoi. I leucofiti posseggono oltre ai due caratteri sopra citati (presenza di plasti e assenza di pigmenti assi-

milatorii) un altro carattere comune, cioè la presenza di riserve glucidiche figurate, quali l'amido e il paramilo; tale carattere, come vedremo, è strettamente legato alla presenza di un leucoplasto. Tutte le recenti ricerche di fisiologia vegetale fatte da GUILLERMOND, MANGENOT, PLANTEFOL e EMBERGER hanno messo in luce parecchi fatti importanti, e cioè:

I<sup>o</sup>) - Tutte le volte che il fenomeno della sintesi dell'amido è stato seguito con cura, si è visto che l'amido si forma nell'interno di un plasto;

II<sup>o</sup>) - I plasti non si possono formare *ex novo*, ma derivano, per divisione da plasti preesistenti;

III<sup>o</sup>) - I plasti, allo stato di riposo funzionale, hanno esattamente la stessa forma e gli stessi caratteri microfisici e microchimici dei *condriosomi*, coi quali essi si confondono nelle cellule embrionali formando con questi un *condrioma* di apparenza omogenea;

IV<sup>o</sup>) - I plasti non si distinguono dai condriosomi che per il loro potere di accumulare e elaborare durante il corso della differenziazione cellulare, clorofilla, pigmenti carotinoidi e amido, e acquistano una forma loro propria per il fatto stesso della generazione di tali prodotti. Queste modificazioni di forma possono essere transitorie nel caso di produzione d'amido, possono essere anche definitive nel caso di produzione di clorofilla, inquantochè il plasto, caricandosi di pigmento, si ipertrofizza e prende l'aspetto di un grosso corpo sferico: solo in certi casi, perdendo la clorofilla, riprende la forma di minuscolo condriosoma.

Ma qualunque sia il grado di affinità fra questi due organi, restano pur sempre due fatti incontestabili: la produzione di amido avviene per opera dei plasti e i plasti hanno una continuità genetica. Si trattava quindi di mettere in evidenza il plasto nei leucofiti che possedendo riserve amilacee dovevano pur possedere l'organo deputato a tale funzione. La tecnica necessaria a tale scopo è tanto delicata che non sempre è facile mettere in evidenza il leucoplasto; VOLKONSKY (1930) ha dimostrato per la prima volta l'esistenza del leucoplasto in *Polytoma obtusum*; LWOFF e PROVASOLI (1935) in *Polytoma caudatum*, var. *astigmata*; HOVASSE (1937) in *Polytoma uvella*. Si può considerare che probabilmente tutte le specie rappresentanti il genere *Polytoma* hanno un leucoplasto. BÜTSCHLI (1868) descrisse in *Chilomonas paramoecium* un organo reticolato superficiale (simile al leucoplasto di *Polytoma*) e gli attribuì una funzione nella formazione dell'amido. Tale organo è stato veduto anche da altri Autori di cui nessuno però utilizzò la tecnica fina di VOLKONSKY e non portò quindi la dimostrazione della natura leucoplastica di questa formazione reticolata, per quanto a priori sembri difficile di mettere tale natura in dubbio. BAKER (1933) infine descrive un leucoplasto in *Euglena gracilis* coltivata all'oscurità. Esiste quindi già fin d'ora un certo

numero di osservazioni sicure che comprovano che là dove ci sono dei materiali di riserva glucidica esiste un plasto che li ha prodotti: ciò è anche confermato dalle esperienze eseguite con *Euglena Mesnili* (A. LWOFF e H. DUSI, 1935) che dimostrano che là dove non ci sono i plasti non ci sono riserve glucidiche. *Euglena Mesnili* perde progressivamente e totalmente i suoi plasti con una lunga permanenza all'oscurità, e con essi perde progressivamente i granuli di paramilo prima abbondanti.

La definizione dei caratteri dei leucofiti: presenza di un plasto e sintesi delle riserve glucidiche figurate, assenza di pigmenti assimilatori, permette dunque di dividere nettamente i leucofiti sia dai clorofiti (presenza di pigmento assimilatore), che dai protozoi propriamente detti (assenza di plasto e di riserve di amido o paramilo).

Vedremo più oltre nel capitolo speciale, comparando la fisiologia di questi tre gruppi, che ciascuno di essi possiede caratteri fisiologici propri e stabili, che dipendono strettamente dalla loro costituzione morfologica.

\* \* \*

La serie dei ricerche personali di cui è oggetto il presente lavoro incominciarono nell'ottobre 1934 e furono proseguite fino ad oggi, parte all'Istituto Pasteur di Parigi e parte nel Laboratorio di Entomologia Agraria di Milano. Il nostro maestro prof. R. GRANDORI ci aveva suggerito l'opportunità di eseguire delle ricerche fisiologiche sulla nutrizione dei protozoi che sono normalmente presenti nel terreno agrario e ci inviò all'Istituto Pasteur presso il prof. André LWOFF per imparare la tecnica da lui adoperata per tali ricerche. Noi ottenemmo subito di poter isolare in coltura batteriologicamente pura *Polytoma caudatum* var. *astigmata* trovato in un terreno di brughiera concimato di fresco, e ne studiammo la fisiologia in collaborazione con LWOFF. Eseguimmo anche una coltura pura di *Kahlia acrobates* che si trovava presente nello stesso terreno. Non essendo ancora possibile, almeno per la gran maggioranza delle specie, eseguire delle ricerche fisiologiche sui Ciliati poichè in generale essi sono altamente specializzati ed hanno bisogno di fattori di crescita sconosciuti, pensammo di proseguire le nostre ricerche e di estenderle alle specie del genere *Polytoma* che è fra quelli più frequentemente rappresentati nei terreni concimati.

Perciò eseguiamo noi stessi una serie di raccolte di terre provenienti da diverse località italiane e francesi, e chiedemmo a parecchi nostri corrispondenti di inviarci campioni di terra e di fango; potemmo così avere circa un centinaio di campioni che provenivano da località diverse di Russia, Portogallo, Francia, Olanda, Sumatra, Kenia, Cecoslovacchia ed Italia. Tutti questi campioni furono adoperati per ottenere delle cul-

ture brute. Potemmo così isolare sedici ceppi del genere *Polytoma* in culture pure monofiletiche, e li studiammo fisiologicamente e morfologicamente. Tale studio ci fu altamente proficuo non solo perchè potemmo mettere a punto una tecnica di sperimentazione che ci fu e ci è preziosa, ma anche perchè le quattro specie di cui studiammo diversi ceppi sono tipiche e rappresentano quattro tappe della nutrizione carbonata. La sicurezza dei nostri risultati ci spinse a studiare accuratamente la morfologia delle varie specie del genere *Polytoma*.

Potemmo così sciudere dal « Sammelart » *Polytoma uvella* il tipo *obtusum* ed erigerlo a specie con LWOFF, delimitando i caratteri morfologici e fisiologici propri di queste due specie. La comparazione dei risultati ottenuti coi vari ceppi di ogni specie ci convinse che i caratteri fisiologici di ogni specie sono stabili, e che essi, là dove i caratteri morfologici non sono molto distintivi, possono servire con questi a definire in un nuovo e valevole modo la specie.

Durante il corso delle ricerche sul genere *Polytoma* ebbimo pure a notare che gli acidi grassi, che fino ad allora venivano adoperati ad una concentrazione omogenea del 2-3 ‰, potevano avere un effetto tossico a tale concentrazione, ed incominciammo ad applicare delle prove di non-tossicità.

Tali prove ci permisero di comprendere le divergenze che esistevano fra i vari Autori a proposito dell'assimilazione dell'acido caproico da parte dei leucofiti e dei clorofiti privati della funzione clorofilliana. Noi potemmo infatti constatare che l'acido caproico è l'acido grasso a minor numero di atomi di carbonio che faccia sentire un effetto nettamente tossico per quasi tutte le specie studiate, anche a concentrazione dell' 1 ‰.

Ci preoccupammo di estendere le ricerche agli acidi grassi a catena più lunga di quella dell'acido caproico. Tali acidi erano stati considerati dai nostri predecessori inusufruibili perchè essi li avevano sperimentati a concentrazioni tossiche. Facendo prove di non-tossicità con successive diluizioni arrivammo a sperimentare a concentrazioni sicuramente non tossiche e ad ottenere colture in acidi fino ad allora considerati inusufruibili. Ci apparve allora necessario ricontrollare i risultati ottenuti dai diversi Autori cogli altri leucofiti. Nostra prima cura fu quella di adoperare i prodotti più puri che l'industria potesse fornire per la serie degli acidi grassi, onde evitare il più possibile gli errori derivanti da eventuali impurezze. Adoperammo per questi ceppi la tecnica impiegata nelle prime ricerche sui ceppi di *Polytoma*, tecnica che per gli abbondanti controlli fatti e la ripetizione delle esperienze con passaggi in serie, sola ci poteva dare la sicurezza dei risultati ottenuti. Per la maggior parte di queste specie potemmo ottenere risultati favo-

revoli con acidi grassi a catena più lunga di atomi di carbonio di quella dell'acido caproico, e portammo man mano le nostre ricerche fino all'acido miristico; non credemmo opportuno di estenderle ad acidi grassi superiori poichè notammo che già con l'acido laurico l'effetto favorevole si andava indebolendo. Le prove di non-tossicità che noi per primi abbiamo introdotto nelle sperimentazioni sulla fisiologia dei protozoi, ci hanno permesso dunque di estendere le ricerche ad acidi grassi aventi il numero doppio di atomi di carbonio di quelli fino ad allora sperimentati, e di ottenere un complesso maggiore di dati fisiologici per ogni specie. Ricontrollammo i risultati ottenuti con altre sostanze, e ci dovemmo convincere che realmente l'alcool etilico è un ottimo alimento, anche migliore dell'acido acetico, per parecchie specie. Pensammo di estendere ad una serie di alcool le ricerche sulla nutrizione carbonata dei leucofiti. Sfortunatamente non tutti gli alcool che ci potemmo procurare erano di sicura purezza chimica. I risultati ottenuti ci permettono però fin d'ora di avanzare l'ipotesi, comprovata dalla sperimentazione, che molti alcool possano essere assimilati dalle specie da noi studiate e che essi siano assimilati dopo essere stati ossidati ad acidi grassi. Tale conclusione a cui noi arriviamo, è di grande importanza fisiologica, come sarà più chiaramente spiegato nella discussione dei risultati, poichè dimostra ancora una volta quanto specifico sia il modo di nutrizione dei leucofiti. Siccome tali sostanze organiche idrocarbonate servono da nutrimento specifico del leucoplasto e dei cloroplasti privati della funzione clorofilliana, e sono i prodotti primi che servono a tali organi per la sintesi dell'amido, è estremamente interessante di sapere che abbisognano esclusivamente degli acidi grassi per tale sintesi. Ciò viene a conferma dell'ipotesi di lavoro emessa da LWOFF, che un acido grasso sia uno degli intermediari della sintesi delle sostanze amilacee.

Durante il corso delle esperienze ebbero poi a notare un fatto interessante. Il ceppo LWOFF di *Polytoma obtusum*, che fu isolato nel 1925 ed intrattenuto da allora in un mezzo base peptonato senza acidi grassi, non era più capace di assimilare direttamente l'acido butirrico. Noi potemmo, con un periodo di adattamento, ottenere di nuovo abbondanti colture in mezzo base + acido butirrico: occorsero a questo scopo, nel 1936, sessanta giorni di periodo adattativo.

È questo il primo caso fino ad ora riscontrato sperimentalmente nei Protozoi della produzione di un enzima adattativo. Fatti consimili si sono potuti riscontrare recentemente per batteri e lieviti, ed hanno provocato parecchie teorie e un buon numero di lavori interessanti. Il ceppo PROVASOLI di *Polytoma obtusum* appena isolato (1935) poteva assimilare direttamente l'acido butirrico; dopo un solo anno di passaggi in serie in mezzo base sprovvisto di acidi grassi, esso aveva pure bisogno.

come il ceppo LWOFF, di un periodo di adattamento per poter assimilare il butirrato. Il periodo di adattamento occorrente per tale ceppo, coltivato da soli due anni in un mezzo base sprovvisto di acidi grassi è molto più corto (27 giorni) di quello del corrispondente ceppo LWOFF.

Abbiamo potuto inoltre adattare questi due ceppi alla produzione dell'enzima necessario ad assimilare l'acido caproico, che al momento dell'isolamento dalla coltura bruta, essi non avevano potuto assimilare direttamente.

Noi pensiamo che con questi fenomeni si apre un campo di ricerche estremamente interessante che permetterà col materiale Protozoi, di risolvere alcune delle questioni fondamentali riguardanti la produzione di enzimi da parte dei microorganismi con periodi di adattamento diretto o provocato dal passaggio in mezzi preparatorii. I Protozoi presentano il vantaggio di avere lunghi periodi di adattamento che, contrariamente ai batteri i cui periodi adattativi sono estremamente corti, permettono agli sperimentatori di poter seguire più facilmente e nettamente tale gruppo di fenomeni. Noi speriamo in una serie di ricerche già intraprese su questi due ceppi, e su altri, di poter apportare nuova luce al problema.

\* \* \*

Ci sentiamo in dovere di ringraziare ancora una volta particolarmente il nostro maestro prof. R. GRANDORI che ci ha spinti, aiutati, e consigliati in questo nostro indirizzo di ricerche; il Monte di Pietà di Milano banditore della borsa di studio « Arnaldo Mussolini » di cui noi usufruimmo e la Fondazione Rockefeller che ci permise di prolungare il nostro soggiorno in Francia con una speciale sovvenzione.

Ci è grato poter testimoniare qui la nostra riconoscenza ed il nostro commosso compianto per il prof. F. MESNIL che ci accordò nel suo « Servizio di Protistologia » dell'Istituto Pasteur la più larga ed ospitale accoglienza. Siamo particolarmente riconoscenti al prof. André LWOFF che ci ha istradati, guidati e consigliati costantemente, con la sua grande esperienza, nel nostro lavoro.

Ringraziamo pure i proff. A. LWOFF, H. DUSI ed E. G. PRINGSHEIM che hanno voluto gentilmente mettere a nostra disposizione i loro ceppi delle varie specie e con essi i colleghi KORSCHIKOFF, ROTTIER, MOEVUS, DEFLANDRE, per il loro interessamento e per l'invio dei campioni di terra. Ci è poi particolarmente grato il ricordare la signora Luigia GRANDORI che ci aiutò sempre gentilmente nello studio morfologico delle specie, e il prof. A. PASCHER per i validi consigli da lui datici a tale proposito.

## TECNICA DELLA SPERIMENTAZIONE

1) *Culture brute e culture batteriologicamente pure.* — Molti dei ceppi che noi abbiamo studiato provengono dalla collezione dell'Istituto Pasteur, altri dalla collezione del *Pflanzenphysiologisches Institut* di Praga, e una parte dalla nostra collezione personale. Tutti questi ceppi, ad eccezione del ceppo *Polytoma uvella* (ceppo 1921 di E. G. PRINGSHEIM), sono monofletici, cioè provengono da un solo individuo. La realizzazione della coltura batteriologicamente pura con lavaggi di un solo individuo è già stata descritta da LWOFF nella sua monografia sulla nutrizione dei protozoi. Non sarà male però ripetere e descrivere minutamente tale tecnica.

Il primo passo per ottenere una coltura pura è quello di scegliere il materiale in cui facilmente si trovano le specie che interessano. Generalmente i leucofiti si trovano in terreni concimati di fresco ed in pozze, stagni e stagni contenenti sostanze organiche in putrefazione (piante o sterco di animali), mentre i clorofiti si trovano in laghetti, stagni naturali o in acque leggermente correnti.

Si procede alla raccolta di campioni di terra o di acque e con ciascuno di questi si fanno tentativi di coltura brutta, con i diversi metodi e i mezzi usati a tale scopo. Ci limiteremo ad elencare brevemente i metodi che ci hanno dato i migliori risultati. Si può sciogliere una parte dei piccoli campioni di terra in acqua pura entro capsule Petri, o in una infusione di fieno, oppure porla in tubi inclinati di agar di Musgrave Clegg, ricoperti con acqua potabile a cui si aggiunge, o no, acetato di sodio. Ci ha dato pure ottimi risultati il sistema descritto da PRINGSHEIM, consistente nell'aggiungere una presa di terra del campione prelevato, oppure un po' di liquido raccolto, a tubi contenenti terra o torba ricoperta d'acqua (sterilizzati a vapore fluente) in cui sono presenti piccole quantità di amido, oppure pezzetti di formaggio o semi di grano. Le culture brute che generalmente si sviluppano con rapidità, devono essere sorvegliate e seguite accuratamente, perchè ben presto un rapido sviluppo di forme batteriche inquina i liquidi colturali, uccidendo spesso le forme che si desidera isolare.

Ottenuto un primo sviluppo dei protozoi, si eseguono analisi micro-

scopiche per accertare la presenza e l'identità delle forme presenti nel campione raccolto. Se ve ne saranno di interessanti al nostro scopo, si preleverà per mezzo di una pipetta capillare il più gran numero possibile di individui appartenenti alla specie che si vuole isolare e si inoculeranno nuovamente nei mezzi che hanno dato il miglior risultato nella prima coltura bruta. Difficilmente con questa prima serie noi saremo riusciti ad eliminare tutte le altre forme presenti di microrganismi, e senza dubbio i batteri resteranno e si svilupperanno abbondantemente anche in questa seconda coltura. Sarà meglio dunque procedere ad un nuovo isolamento della specie che ci interessa, preparando parecchi tubi contenenti diversi mezzi colturali, entro i quali si introducono uno o più individui della specie da isolare. I mezzi che converranno di più per questo terzo passaggio, sono quelli all'agar Musgrave Clegg, addizionato d'acqua e d'acetato di sodio, e quelli sopra descritti di PRINGSHEIM alla terra o torba e amido: per gli organismi abituati ad un ambiente acido il mezzo della torba amido; per gli organismi abituati ad ambiente alcalino il mezzo terra-amido. Se si sviluppa la coltura nei tubi in cui si inoculò un solo individuo, noi avremo ottenuto una *coltura clonica impura*; ad ogni modo da questa coltura noi potremo partire con maggiore tranquillità per gli ulteriori tentativi per ottenere colture pure. La tecnica impiegata a questo scopo consiste nel prelevare una goccia della coltura impura e nel mescolarla con una goccia di un liquido sterile a base di peptone e di acetato di sodio, posta su un vetrino portaoggetti, in una capsula di Petri sterile. Sarà opportuno adoperare per queste operazioni pipette in vetro neutro e porta oggetti in vetro neutro affinché il pH non venga cambiato. Si lasceranno i protozoi in queste due gocce miscelate per una ventina di minuti affinché si abituino al nuovo mezzo; poi si incominceranno le operazioni vere e proprie di lavaggio. Si prepara dapprima un certo numero di capsule di Petri sterili contenenti dei vetrini neutri, sui quali si depositano con una pipetta Pasteur delle gocce di liquido culturale sterile. Con l'aiuto di un microscopio binoculare e di pipette capillari sterili, si scelgono dalla prima goccia dieci o dodici protozoi che nuotino vigorosamente e si trasportano rapidamente nella seconda goccia in cui si lasciano durante cinque minuti. Si sceglierà allora, fra gli altri, l'individuo che si dimostrerà il più attivo e resistente, lo si pescherà con la pipetta capillare e lo si trasporterà nella terza goccia sterile. In seguito questo protozoo sarà trasportato, prelevando la minima quantità di liquido possibile, successivamente da una goccia all'altra, e sarà lasciato in ogni goccia per due o tre minuti.

Durante questi bagni e la permanenza nelle gocce, il protozoo nuotando si libererà dai batteri che erano aderenti alla sua membrana cellulare. D'altra parte i batteri trasportati originariamente col primo pre-

lievo del protozoo, verranno eliminati per diluizione successiva per il trasporto da goccia a goccia.

In generale dieci lavaggi in dieci gocce sterili servono ad ottenere un protozoo che seminato nel liquido colturale finale dà luogo ad una coltura pura libera da batteri. Non sarà però inopportuno di eseguirne, per precauzione, una quindicina. Le pipette capillari devono essere fatte in modo che la parte capillare abbia un diametro tre o quattro volte più grande del diametro del protozoo che si vuole isolare. Non occorre di provocare alcuna aspirazione mediante tettine di gomma poichè il liquido e il protozoo che si vuol aspirare montano automaticamente per capillarità nella pipetta. Questa tecnica è stata adoperata da LWOFF per gli isolamenti di *Glaucoma pyriformis* (1923), e in seguito per tutti gli altri isolamenti da lui fatti; è stata egualmente adottata da PRINGSHEIM (1937) e da noi (1935-1938). Il liquido che si adopera per il lavaggio e per la prima coltura pura è generalmente acqua peptonata contenente acetato sodico, portata ad un pH che nell'esperimento nella coltura impura si è dimostrato favorevole allo sviluppo degli organismi in istudio.

Non sempre si ottiene una coltura della forma che è stata lavata e seminata, e gli insuccessi possono dipendere o dalla cattiva scelta del protozoo o dalla pipetta capillare troppo fina che provocò aspirazioni troppo rapide, oppure dalla composizione chimica del mezzo in cui è seminato l'individuo lavato. Certe specie sono particolarmente esigenti e fisiologicamente specializzate, e per esse occorre una serie di lavaggi e di semine differenti. Le colture impure sfortunatamente non ci danno alcun indizio di quella che può essere la esigenza alimentare, poichè i prodotti di demolizione batterica ivi contenuti sono estremamente varii, e fra essi moltissimi, di natura a noi sconosciuta, sono necessari allo sviluppo dei protozoi. Per giungere alla coltura pura non resta quindi che tentare molti mezzi di differente composizione.

2) *Prove batteriologiche.* — Se le operazioni sopra descritte di lavaggio sono eseguite rapidamente in un luogo riparato da correnti d'aria, al coperto dalla polvere, e lavorando correttamente, si ottiene dopo 10-15 lavaggi, a colpo sicuro, un flagellato puro e senza batteri, quindi una *coltura pura*. A seconda delle specie, dalla prima semina si otterrà un abbondante sviluppo, in un periodo variante fra i cinque e i venti giorni. Per assicurarci che il ceppo monofiletico così ottenuto è privo di batteri noi abbiamo eseguito una serie di prove batteriologiche:

a) *esame diretto della coltura*, prelevando dal fondo una goccia di liquido ed esaminandola a fresco al microscopio con obiettivo ad im-

mersione in campo chiaro ed in campo scuro; ed inoltre eseguendo degli strisci fissandoli e colorandoli,

b) *semina in vari mezzi adatti alla crescita dei microorganismi*: brodo di carne peptonata, brodo di carne all'agar, agar di Musgrave Clegg, agar di Sabouroud, agar Veillon per anaerobiosi, brodo al sangue, agar-brodo-sangue. Tali semine sono state fatte in doppia serie, una incubata a temperatura di laboratorio, l'altra a 37°.

Queste prove batteriologiche vennero seguite e verificate sia macroscopicamente che microscopicamente, con esame diretto e con strisci colorati. Durante gli esperimenti tali prove vennero ripetute frequentemente per assicurarci dell'assenza di ogni infezione.

I tubi delle serie che servirono alle conte dei protozoi vennero adoperati dopo le numerazioni per le semine in questi stessi mezzi batteriologici e risultarono sempre sterili.

3) *Vetrierie*. — Tutti gli esperimenti da noi compiuti sono stati eseguiti con vetreria neutra Pyrex, Sibor e vetro neutro Tenax-Murano. È notorio che occorre adoperare per queste ricerche una vetreria neutra che, sola, permette di mantenere i mezzi colturali ad un pH determinato anche se le colture rimangono per lungo tempo nei recipienti.

La vetreria in ogni caso, fu sempre lavata chimicamente per essere sicuri di non introdurre sostanze sconosciute nei liquidi colturali e per non alterare la composizione chimica. All'uopo la vetreria, dopo essere stata in acqua calda e soda e passata allo spazzolino, risciacquata abbondantemente in acqua, viene passata per 48 ore nella miscela sulfo-cromica, e per 6-12 ore in acido nitrico. Da ultimo si eseguono ripetuti lavaggi in acqua per eliminare ogni traccia di acidi, e finalmente si risciacqua in acqua distillata.

4) *Prodotti chimici*. — Crediamo importante di enumerare le provenienze di tutti i prodotti chimici che sono stati da noi impiegati nelle esperienze. I prodotti organici che non si sono ottenuti ancora sinteticamente sono più o meno impuri, ed il grado di purezza varia da confezione a confezione. Ci siamo preoccupati di fornirci, specialmente per le serie degli acidi grassi, dei prodotti più puri esistenti attualmente in commercio, e crediamo di essere i primi ad avere impiegato, in ricerche di questo genere, quattro acidi grassi di origine sintetica.

Le provenienze dei prodotti chimici da noi usati furono:

SALI INORGANICI

Prodotti MERK

solfato di magnesio (puro per analisi)  
cloruro di potassio (puro per analisi)  
idrato di sodio (puro per analisi)

Prodotti SHERING KALBAUM

bifosfato di potassio (puro per analisi)

PEPTONI

Prodotti E. VAILLANT

peptone pancreatico di muscolo 5 C.

Prodotti HOFFMANN-LA ROCHE

peptone di seta idrolizzata

ACIDI ORGANICI

Prodotti MERK

acetato di sodio (per analisi *sintetico*)  
acido succinico albissimus (per analisi)  
» malico inattivo (puro)  
» tartarico (puro)

Prodotti FRAENKEL ET LANDAU

acido propionico (*sintetico* da cianetile)  
» butirrico n. (*sintetico* purissimo)  
» isobutirrico (purissimo)  
» valerianico n. (purissimo)  
» isovalerianico (purissimo)  
» caproico n. (*sintetico*)  
» isocaproico (purissimo)  
» eptilico (purissimo)  
» octilico (purissimo)  
» nonilico (purissimo)

acido decilico (purissimo)  
» laurilico (purissimo)  
» miristico (per analisi)

Prodotti RHONE-POULENC

acido lattico puro D. = 1,21

Prodotti HOFFMANN-LA ROCHE

piruvato di sodio

ALCOOL

Prodotti MERK

alcool metilico  
» etilico  
» propilico  
» isopropilico  
» butilico  
» isobutilico  
» butilico secondario  
» butilico terziario  
» isoamilico

Prodotti RHONE POULENC

alcool amilico  
» dietililico  
» cicloesano

Prodotti PETROL YUPITER

alcool amilico secondario

Prodotti VERLAY

alcool dimetililico

Prodotti di LABORATORIO

alcool esilico puro E<sub>15</sub> = 84°

È evidente che allo stato attuale del commercio dei prodotti chimici, come si può rilevare dalla lista da noi data, noi manchiamo di una serie completa di prodotti che ci diano la sicurezza dei risultati delle esperienze di nutrizione: non possiamo quindi essere sicuri che dei risultati ottenuti con prodotti di sintesi, i soli che ci garantiscano la purezza chimica e l'assenza di altre sostanze che possono essere eventuali fattori di crescita. Come si potrà vedere più avanti, nella descrizione della nutrizione di ciascuna specie, LWOFF e DUSI hanno potuto ottenere colture ottime in mezzi puramente sintetici con molte delle specie in istudio qualora venissero aggiunti i necessari fattori di crescita.

Le nostre esperienze sono state tutte forzatamente condotte in un mezzo base al peptone (sostanza di composizione chimica non definita), per poter comparare le varie specie fra di loro, dato che il nostro studio è stato iniziato prima che si conoscessero i fattori di crescita necessari ai vari microorganismi.

Però tutte le nostre esperienze sono state fatte preparando i mezzi nutritivi con un solo lotto di peptone proveniente da una unica lavorazione; per ciascun gruppo di esperienze venivano preparati parecchi litri di soluzione nutritizia, della quale una parte era usata come mezzo di controllo (senza acidi organici) mentre all'altra venivano aggiunte le varie sostanze in esperimento.

Dato che l'effetto di ogni sostanza sperimentata è stato valutato mediante comparazione numerica della popolazione ottenuta con quella del controllo, pensiamo che i nostri risultati siano ben provati. Per gli acidi grassi la sicurezza assoluta esiste solamente per quei quattro acidi sintetici che abbiamo potuto procurarci. Per tutti gli altri, nonostante sia stata nostra cura procurarci i più puri prodotti esistenti in commercio, non si può escludere che contengano delle impurità di acidi omologhi.

Quando si potrà ottenere una serie completa di acidi organici sintetici, sarà necessario un controllo di tutte le esperienze finora fatte. Tuttavia, poichè abbiamo lavorato con concentrazioni di acidi grassi molto piccole, dimodochè l'influenza delle eventuali impurità non dovrebbe avere gran peso sui risultati, pensiamo che ben poche modificazioni potranno essere apportate nella lista degli acidi organici utilizzati da ogni singola specie.

5) *Metodica delle esperienze.* — Tutte le esperienze sono state da noi eseguite in mezzi nutritizi liquidi, poichè essi soli permettono di stabilire quantitativamente il grado di assimilazione e l'effetto delle varie sostanze in esperimento. Infatti i mezzi culturali solidi, che sono largamente impiegati per i batteri, non servono a coltivare tutte le specie da noi studiate, e per quelle che vi possono crescere non darebbero una costanza di risultati e non si presterebbero agli esami necessari per stabilire e valutare l'effetto prodotto dalle sostanze in esperimento.

Abbiamo adoperato la seguente soluzione salina come *mezzo base*:

|                                     |                      |
|-------------------------------------|----------------------|
| acqua bidistillata . . . . .        | cc <sup>3</sup> 1000 |
| cloruro potassico . . . . .         | gr. 0,20             |
| fosfato acido di potassio . . . . . | » 0,20               |
| solfato di magnesio . . . . .       | » 0,20               |

Chiameremo *mezzo base al peptone pancreatico* il mezzo in cui in più della soluzione salina sopracitata furono aggiunti gr. 4 di peptone pancreatico di carne (5 C. Vaillant); e *mezzo base al peptone di seta* quello in cui oltre alla parte salina aggiungemmo gr. 4 di peptone di seta idrolizzata (HOFFMANN-LA ROCHE).

Abbiamo utilizzato per tutte le prove di nutrizione, tubi d'assaggio in vetro neutro aventi un diametro esterno di 16 mm. e una lunghezza di 16 cm. Generalmente erano riempiti con 10 cc. In casi speciali e raris-

simi, quando si voleva ottenere una crescita veloce per specie fortemente avida di ossigeno, i tubi si riempiono con soli 5 o 6 cc. Le inoculazioni sono sempre state fatte adoperando le pipette di Pasteur. Il numero di gocce che servirono nella semina varia a 1 a 5 gocce a seconda degli organismi in istudio. In queste condizioni di sperimentazione, colle gocce che si adoperano per la semina si potrebbero portare nel nuovo mezzo nutritizio delle sostanze la cui azione alimentare può essere notevole. Per evitare tale causa di errore noi abbiamo sempre fatto parecchi trapianti per ognuno dei mezzi culturali in istudio e le serie di trapianti successivi partì sempre dal *ceppo* (coltura nel solo mezzo base senza acidi grassi).

Sarà opportuno spiegare dettagliatamente come avviene lo studio della nutrizione carbonata di una specie, a partire dall'ottenimento della cultura pura. Come abbiamo detto più sopra l'inoculazione di un solo individuo è stata da noi fatta in un mezzo nutritizio al peptone + acetato di sodio. Da questa prima coltura si parte per la serie di ricerche necessarie allo studio della nutrizione. Dal primo tubo originale si semina con una goccia un tubo contenente lo stesso mezzo adoperato per la prima coltura, ma senza acetato (mezzo base), ed un altro tubo contenente un mezzo uguale al mezzo originario (cioè mezzo base + acetato).

Una serie di cinque o sei inoculazioni successive nel mezzo base, partendo dal primo tubo, serve ad eliminare le tracce di acetato di sodio portate con la prima goccia proveniente dal tubo capostipite. Soltanto dopo il sesto passaggio in peptone si ottiene un *ceppo* che si può considerare completamente sprovvisto di tracce di acido acetico e che si può adoperare come tubo origine delle semine nei vari mezzi contenenti acidi grassi. Tutte le volte che noi parleremo di *ceppo* si tratta di una coltura di tal genere proveniente dalla prima coltura monofiletica e coltivata in un mezzo base peptonato sprovvisto di ogni traccia di acidi grassi.

Per iniziare lo studio della nutrizione carbonata, noi siamo sempre partiti dal *ceppo* inoculando con una o tre gocce una serie di tubi contenenti le diverse sostanze in esperimento aggiunte al mezzo di base che è sempre stato tenuto come controllo. Alcuni dei tubi contenenti sostanze favorevoli rispondono dando una coltura abbondante e di gran lunga superiore al controllo (coltura ottenuta nel mezzo base). Da ciascuno di questi tubi favorevoli si effettua una serie di semine successive, tutte in mezzi contenenti questa stessa sostanza. Al termine di 7 od 8 semine successive, dopo aver controllato di avere raggiunta nelle colture che così si ottengono, una costante velocità di sviluppo e una popolazione presso a poco equivalente, si procede all'analisi quantitativa dell'influenza delle sostanze in esame (conta degli individui contenuti in ogni mm.<sup>3</sup> di mezzo nutritizio). Noi crediamo opportuno il controllo di successive semine

nello stesso mezzo per verificare che l'effetto non sia stato temporaneo ed occasionale.

Altre sostanze non hanno alcun effetto sulla crescita degli organismi in esame e le colture ottenute si sviluppano all'incirca come le colture controllo coltivate nel mezzo base. In questo caso noi ripetiamo le prove con semine più abbondanti (10 e 20 gocce a partire dal ceppo), oppure seminando con una o tre gocce di culture sviluppate in presenza di acido acetico, poichè essendo l'acido acetico sempre estremamente favorevole, noi con una o tre gocce seminiamo un gran numero di individui. Se si sviluppa una coltura con quest'ultimo tentativo, si fa in seguito una serie di trapianti, per essere sicuri di avere eliminato tutte le tracce di acido acetico portato con la semina. Quando nei tubi contenenti le sostanze in esperimento, che erano stati seminati con individui del ceppo, non si ebbe alcuno sviluppo, oppure si ottenne una coltura di densità di popolazione inferiore alla coltura-controllo, dubitammo che la crescita potesse essere stata arrestata da un effetto tossico dovuto alla concentrazione, ed allora eseguimmo prove di non-tossicità. Le sostanze in istudio vanno, a questo scopo, adoperate successivamente a concentrazioni sempre più diluite fino a che esse permettono almeno una moltiplicazione uguale a quella del controllo; arrivati a questo punto si esegue la prova di più forte inoculazione come abbiamo descritto più sopra.

Naturalmente ci siamo preoccupati di non sperimentare a concentrazioni vicine alla concentrazione tossica. La concentrazione tossica può variare per lo stesso acido da specie a specie.

Ci sembra che la sperimentazione condotta secondo questi principi sia la più adatta a dare dei risultati sicuri, inquantochè ogni risultato è ricontrollato con serie di trapianti successivi in presenza della sostanza in istudio. D'altra parte il fatto di aver preso la precauzione elementare di verificare la tossicità di ogni sostanza ci ha portato a conclusioni molto diverse da quelle dei nostri predecessori, che non avendo fatto tale esame giunsero a conclusioni inesatte e perfino contrastanti nei loro diversi lavori.

Ricordiamo che i nostri predecessori, appunto perchè adoperarono una concentrazione fissa di 2 o 3‰, conclusero che l'acido grasso a catena più lunga, utilizzabile, era l'acido caproico (il quale però a tale concentrazione è già tossico per parecchie specie ed era stato considerato come inattivo), mentre noi siamo arrivati ad ottenere risultati nettamente positivi con acidi aventi un numero doppio di atomi di carbonio (acido laurinic).

Anche a prescindere dalla prova di tossicità, i metodi di sperimentazione adoperati da noi e dalla scuola di LWOFF eliminano altre cause di errori e di incertezze e semplificano le manipolazioni.

6) *Reazione del mezzo nutritizio*. — Un'altra cosa indispensabile per la condotta delle esperienze, appena ottenuta la coltura pura, è di stabilire i limiti delle variazioni delle concentrazioni in ioni H e OH compatibili collo sviluppo delle culture, di determinare il pH optimum e di effettuare lo studio delle fisiologia delle varie specie in mezzi nutritizi a pH vicino od eguale al pH optimum. Ricordiamo inoltre, come è già stato detto più sopra, che le più grandi precauzioni sono state da noi prese per assicurarci che tutta la vetreria impiegata (tubi d'assaggio, pipette, palloni e bevute di Erlenmeyer) fosse chimicamente pura.

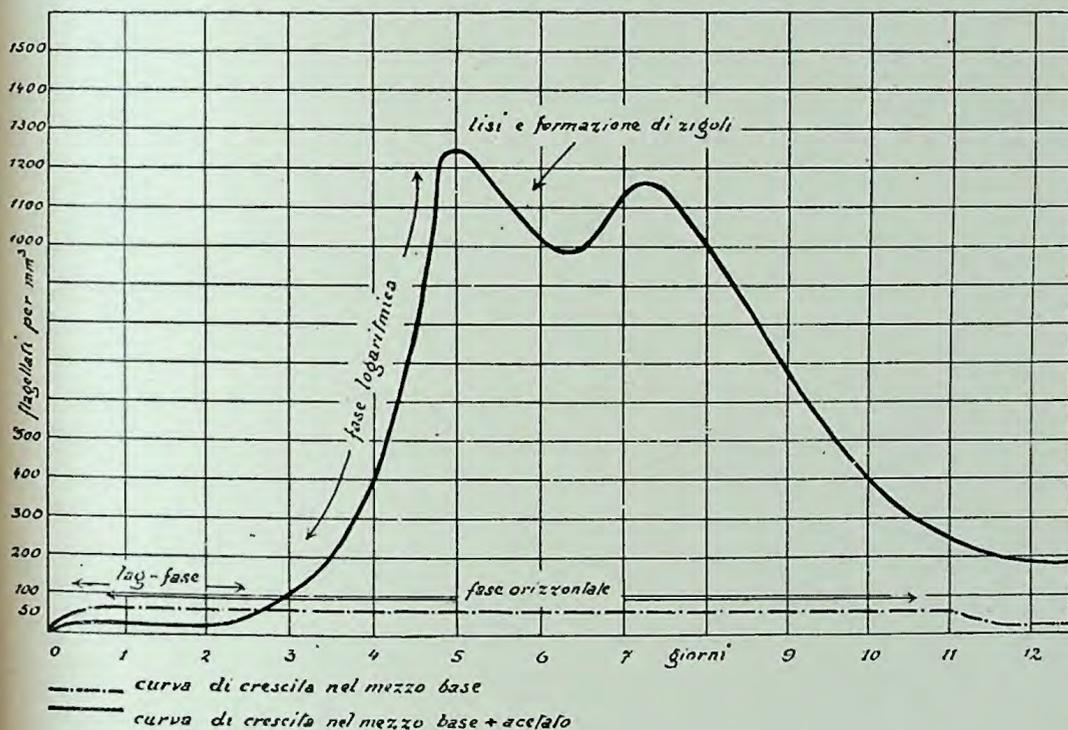
7) *Numerazioni*. — L'accertamento delle proprietà favorevoli o sfavorevoli di una sostanza rispetto a un dato ceppo, non sarebbe difficile se lo sviluppo nel mezzo base (controllo) fosse nullo, mentre nel mezzo base più la sostanza in esperimento fosse estremamente abbondante. Dato che noi abbiamo incominciato e condotto tutte le esperienze prima che fossero conosciuti i fattori di crescita necessari ai leucofiti e clorofiti coltivati nell'oscurità (fattori che, del resto, sono ignoti anche oggi per parecchie specie) siamo stati obbligati a sperimentare in un mezzo base composto con sostanze organiche complesse (peptone): in questo mezzo nutritizio senza aggiunta di acidi organici i leucofiti si sviluppano sempre, più o meno abbondantemente a seconda delle specie: la densità delle colture ottenute in questo mezzo nutritizio (che serve di controllo) è da 20 a 260 flagellati per mm.<sup>3</sup>

In tali condizione non si può concludere altrimenti sul valore nutritizio di una sostanza se non facendo una comparazione fra la coltura del mezzo di base e la coltura del mezzo base a cui è stata aggiunta la sostanza stessa. Questa comparazione è relativamente facile poichè lo sviluppo e il punto massimo ottenuto nella coltura sono sufficientemente regolari, qualora si abbia la precauzione di osservare certe regole di sperimentazione. Alcuni fattori fisici e chimici influiscono infatti sulla crescita dei leucofiti. Ad esempio recenti lavori eseguiti sulla nutrizione dei Protozoi hanno potuto accertare che i fattori: rapporto superficie-volume del liquido colturale, concentrazione degli alimenti azotati, e condizioni fisiche, (per esempio temperatura), influenzano largamente lo sviluppo dei Protozoi in coltura. Riportiamo a questo proposito le conclusioni di ROTTIER che ha studiato dettagliatamente l'influenza dei due primi fattori e ha seguito la curva di crescita di *Polytoma obtusum* (ceppo LWOFF).

La crescita, come per tutti i microrganismi, può essere divisa in parecchie fasi: 1) Un periodo di attesa negativo (*lag-phase*); 2) periodo di crescita logaritmica; 3) periodo in cui la crescita logaritmica è arrestata e la crescita prosegue con una velocità minore. L'andamento della curva

varia a seconda del fattore che interviene nell'arresto della fase logaritmica. Nei mezzi peptonati senza acidi grassi lo sviluppo ha luogo nei primi giorni che seguono la semina e poi si arresta ad un determinato punto e vi rimane per parecchi giorni (andamento orizzontale nel grafico). La curva in presenza di acidi grassi, qualora sia eseguita con colture in condizioni costanti, è del tipo a tre fasi più sopra descritto.

Curve tipo delle specie del genere *Polytoma* TABELLA I.



Come ha mostrato ROTTIER, l'arresto della fase logaritmica nei mezzi peptonati contenenti acidi grassi dipende da vari fattori limitanti, di cui l'ossigenazione del mezzo (cioè rapporto superficie-volume) è uno dei più importanti: inoltre egli potè dimostrare che, mantenendo costante allo stato *optimum* l'ossigenazione (insufflando aria nel mezzo di cultura) un altro fattore limitante entra in gioco: la concentrazione delle sostanze azotate.

Per comparare l'effetto ottenuto colle varie sostanze è necessario perciò sperimentare in condizioni di costante rapporto superficie-volume, da cui dipende l'ossigenazione del mezzo, se questo non viene agitato o insufflato con aria, ed inoltre in uguali concentrazioni d'alimento azotato e in condizioni fisiche il più possibile identiche. Noi abbiamo sperimentato sempre in tubi di 16 mm. di diametro dunque a superficie costante contenente 10 cc. di liquido nutritizio cioè a volume costante e a costante

rapporto superficie-volume; il liquido non fu aereato artificialmente nè con l'agitazione nè con insufflazione d'aria. I risultati numerici da noi ottenuti sono ben attendibili per tale condizione di *non aereazione* e per la concentrazione costante in sostanze azotate, del 4 ‰ (peptone di carne pancreatico 5 C. Vaillant). Le nostre esperienze, per il modo con cui vennero eseguite, possono servire alla valutazione dell'effetto dei differenti acidi e alla comparazione fisiologica delle diverse specie. Sarebbe però necessario in seguito stabilire curve di crescita per ciascun acido e per ciascun organismo, in differenti condizioni.

Tuttociò premesso sulla opportunità di sperimentare in determinate condizioni fisse, esponiamo come procedemmo alla valutazione dell'effetto delle varie sostanze sperimentate. La comparazione fra l'effetto ottenuto nel mezzo base e quello ottenuto nel mezzo base a cui sono state aggiunte le sostanze in esperimento è stata fatta in un primo tempo e da tutti gli Autori giudicando il grado di intorbidimento delle colture. Solo recentemente, e non da tutti, tale comparazione vien fatta sulla differenza di sviluppo numerico degli individui sviluppatisi nei mezzi in esame.

Per ovvie ragioni di precisione noi procedemmo sempre alla valutazione numerica. Eseguimmo le conte almeno dopo il quarto passaggio in serie nelle varie sostanze sperimentate. Le numerazioni in ogni tubo furono ripetute parecchie volte con un sistema analogo a quello impiegato da ROTTIER, durante i tre o cinque giorni, comprendenti lo sviluppo delle colture (l'esperienza acquistata nel seguire giornalmente lo sviluppo delle colture durante le inoculazioni in serie ci fornì sempre un dato pratico che ci permise di sapere quando e quanto tale periodo durava). La cifra che indichiamo nelle tabelle corrisponde al massimo di crescita da noi osservato durante la conta per una determinata specie e per una determinata sostanza. Le numerazioni sono state eseguite colla cellula di Nageotte (40 strisce di 1,25 mm.<sup>3</sup>) per le colture povere e coll'ematimetro di Malassez per le colture abbondanti.

Un'altra avvertenza importantissima per ottenere dei risultati attendibili nelle numerazioni è che queste debbono essere fatte in un momento il più possibile vicino a quello dello sviluppo massimo. La scuola americana (HALL, LÖEFER, JAHN) si accontenta di comparare l'effetto delle varie sostanze in esame eseguendo le conte dopo un tempo determinato dall'inoculazione (48-72 ore per es.). Con tale metodo si arrischia di arrivare a conclusioni molto inesatte. Secondo l'andamento delle curve di crescita, sopra descritta, mentre per il mezzo base (peptone solo) la « *lag phase* » è estremamente corta, e si arriva in generale dopo 48 ore allo sviluppo massimo (tale massimo rimane orizzontale per parecchi giorni), per i mezzi contenenti acidi grassi il periodo di « *lag phase* »

precedente quello di accrescimento logaritmico è sufficientemente lungo, e varia a seconda delle concentrazioni a cui le sostanze sono impiegate. Facendo delle conte a tempo determinato, facilmente si potrà sorprendere lo sviluppo del mezzo base, alla fase orizzontale, ma non si può sapere, per i mezzi contenenti altre sostanze in più dei componenti del mezzo base, in qual punto della curva le numerazioni furono eseguite. Ciò può naturalmente portare non solo ad errori sulla valutazione dell'effetto delle varie sostanze, ma anche alla conclusione che esse sono del tutto inutilizzabili; è questo il caso dell'alcool etilico che per LOEFER e HALL sarebbe inutilizzato come alimento carbonato da *Chilomonas paramoecium*.

Noi ottenemmo con tale sostanza e con questa specie abbondantissime culture (716 flagellati per mm.<sup>3</sup> contro 120 del controllo). Gli Autori citati eseguirono le conte dopo 45 ore dall'inoculazione, quando probabilmente le colture erano ancora in « *lag phase* », oppure quando la crescita si stava iniziando: mentre noi ottenemmo il massimo sviluppo delle colture solo dopo 240 ore.

Riteniamo opportuno inoltre che la valutazione dei risultati numerici ottenuti, debba essere sufficientemente elastica in modo da tener conto degli errori probabili insiti nelle condizioni sperimentali. Oltre agli errori, dovuti alla concentrazione ed all'aereazione delle colture, che noi eliminammo nei limiti del possibile, ne esistono altri dipendenti dalle impurezze chimiche delle sostanze e dalle operazioni di numerazione.

Delle impurezze abbiamo già detto in un paragrafo precedente; quanto agli errori delle numerazioni, anche se fatte con buona tecnica, diremo che essi variano dal 4 all'8%, cifra che può essere aumentata se non si eseguono numerazioni parallele e ripetute su un numero abbastanza grande di prove eseguite nelle stesse condizioni e nello stesso mezzo di sperimentazione; numero tale che permetta, facendo la media, di abbassare la percentuale degli errori.

Crediamo opportuno perciò, conoscendo le imperfezioni che ancora incombono sulle sperimentazioni in questo campo, di istituire una base di valutazione fondamentale abbastanza elastica per vagliare praticamente i dati fornitici dalle numerazioni fatte nei singoli mezzi in esperimento.

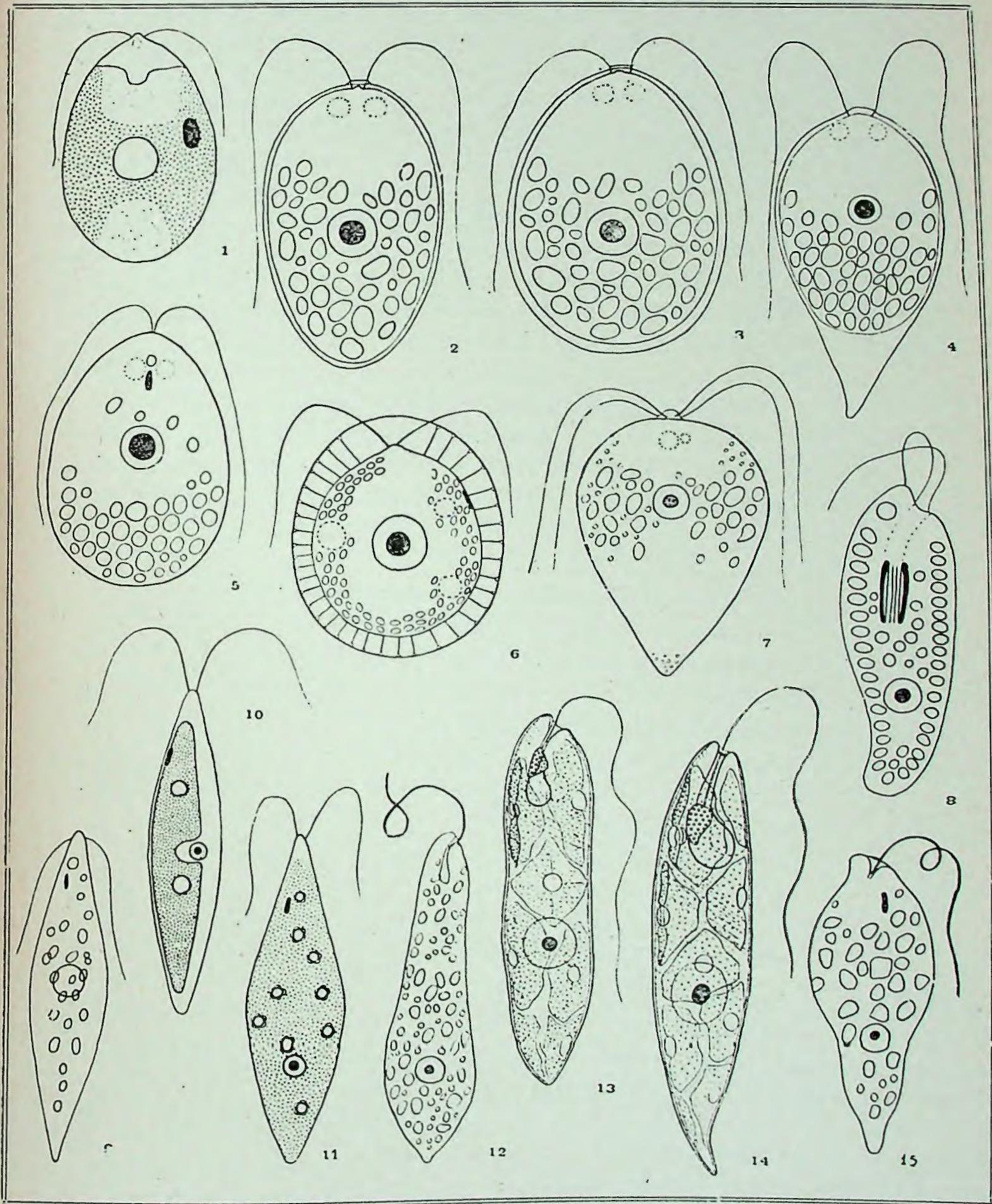
In tale valutazione il numero di individui riscontrato nel mezzo di controllo serve come base alla comparazione. Se il numero degli individui che si sviluppano nel mezzo base più la sostanza in esame è compreso fra quello del controllo e il doppio di questo (una sola divisione cellulare di tutti gli individui del controllo) noi consideriamo che tale sostanza è *inutilizzabile* e che l'effetto ottenuto può essere dovuto in

gran parte agli errori sperimentali sopracitati. Alle sostanze che producono tale effetto corrisponde nelle tabelle il segno —. Se il numero degli individui sviluppatisi nel mezzo in esame è compreso fra il doppio e il triplo di quello riscontrato nel controllo, noi concludiamo che la sostanza in esame ha un *leggero effetto* sulla moltiplicazione (indicato nelle tabelle dei risultati col segno  $\mp$ ). Le sostanze che danno un incremento allo sviluppo compreso fra tre e sei volte quello ottenuto nel controllo sono considerate *utilizzabili e favorevoli* (indicate col segno +). Quelle che danno luogo ad un incremento superiore a sei volte quello del controllo sono considerate come *altamente favorevoli*. (+ + nelle tabelle).

Tale graduazione che si basa da una parte sulla giusta valutazione degli errori probabili commessi, e dall'altra sulla comparazione numerica fra le colture fatte con diverse sostanze e quella del controllo, permette altresì di comparare fra di loro i risultati ottenuti con diverse specie di protozoi aventi ciascuna un proprio coefficiente di oxi-trofia, e ci sembra la più adatta, allo stato attuale, per rappresentare, assieme ai computi numerici, gli effetti delle sostanze sperimentate.

#### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

- 1) *Chlamydomonas agloëformis* (secondo Pascher).
- 2) *Polytoma uvella* (originale)
- 3) *Polytoma obtusum* (originale)
- 4) *Polytoma caudatum* var. *astigmata* (secondo L. Grandori)
- 5) *Polytoma ocellatum* (secondo Francé)
- 6) *Haematococcus pluvialis* (secondo Reichenow)
- 7) *Polytomella coeca* (secondo Pringsheim)
- 8) *Chilomonas paramoecium* (secondo Bütschli)
- 9) *Hyalogonium Klebsii* (secondo Klebs)
- 10) *Chlorogonium elongatum* (secondo Dangeard)
- 11) *Chlorogonium euchlorum* (secondo Pascher)
- 12) *Astasia Chattoni* (secondo Pringsheim)
- 13) *Euglena gracilis* (secondo Chade-faud e Provasoli)
- 14) *Euglena gracilis* var. *urophora* (secondo Chade-faud e Provasoli)
- 15) *Astasia quartana* (secondo Pringsheim)



CLASSIFICAZIONE ADOTTATA

- Tipo: **PROTOZOA**
- Sotto tipo: **Plasmodroma** Dolfein
- Classe: **MASTIGOPHORA** Diesing
- Ordine: **Phytomonadina** Blockmann
- Famiglia: **Chlamydomonadidae** Butschli
- Genere: **Chlamydomonas** Ehrenberg  
*Chlamydomonas agloëformis* Pascher
- Genere: **Polytoma** Ehrenberg  
*Polytoma uella* Ehrenberg  
*Polytoma obtusum* Pascher em. Lwoff e Provasoli  
*Polytoma caudatum* Korschikoff var. *astigmata* R. e L. Grandori  
*Polytoma ocellatum* Francé
- Genere: **Haematococcus** Agardh em. Flotow  
*Haematococcus pluviialis* Flotow em. Wille
- Genere: **Chlorogonium** Ehrenberg  
*Chlorogonium euchlorum* Ehrenberg  
*Chlorogonium elongatum* Dangeard
- Genere: **Hyalogonium** Pascher  
*Hyalogonium Klebsii* Pascher
- Famiglia: **Polyblepharididae** Dangeard
- Genere: **Polytomella** Aragao  
*Polytomella coeca* Pringsheim
- Ordine: **Cryptomonadina** Stein
- Famiglia: **Eucryptomonadidae** Pascher
- Genere: **Chilomonas** Ehrenberg  
*Chilomonas paramoecium* Ehrenberg  
*Chilomonas oblonga* Pascher
- Ordine: **Euglenoidina** Blockmann
- Famiglia: **Euglenidae** Stein
- Genere: **Euglena** Ehrenberg  
*Euglena gracilis* Klebs  
*Euglena gracilis* var. *uropora* Chadefaud e Provasoli
- Genere: **Astasia** Dujardin  
*Astasia Chattoni* Lwoff  
*Astasia quartana* Moroff em. Pringsheim

*Chlamydomonas agloëformis* Pascher

*Caratteri morfologici.* — Questa specie è stata ottenuta da MAINX in coltura monofiletica ed è stata determinata da PASCHER col nome di *Chlamydomonas agloëformis* e definita coi seguenti caratteri morfologici: cellule dorsoventrali, cioè aventi una parte concava e una parte convessa nel senso della lunghezza; viste dall'alto sono oviformi arrotondate nella parte posteriore, di membrana molto fine, munite nella parte anteriore di una piccola papilla ispessita. I flagelli sono lunghi quanto il corpo: cromatofori, a forma di H, (visti lateralmente), stigma grosso, nucleo centrale, due vacuoli contrattili, lunghezza delle cellule 12  $\mu$ , larghezza 7  $\mu$ . Lo studio fisiologico del ceppo di F. MAINX fu compiuto da A. ed M. LWOFF (1929). Tale organismo si sviluppa bene anche all'oscurità mantenendo la propria clorofilla.

*Nutrizione azotata.* — *Chlamydomonas agloëformis* è capace di realizzare la sintesi dei componenti protoplasmatici partendo da sostanze proteiche complesse come i peptoni, ma è pure capace di svilupparsi perfettamente in mezzi nutritizi che contengono un aminoacido come sola fonte di azoto, quali l'asparagina e la glicocola che sono ottime fonti di azoto per *Chlamydomonas agloëformis*. Tutti i tentativi fatti da

*Chlamydomonas agloëformis* (ceppo MAINX) TABELLA 2.

| Mezzo nutritizio base<br>(asparagina 2 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>degli autori | A. e M. Lwoff<br>1929 - 32 | Mezzo nutritizio base<br>(asparagina 2 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>degli autori | A. e M. Lwoff<br>1929 - 32 |
|---|--------------------------------|----------------------------|---|--------------------------------|----------------------------|
| senza acidi (controllo)                                   |                                | —                          | + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                          |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100            | ++                         | + acido glicerofosforico                                  | 2 <sup>o</sup> /100            | —                          |
| + acido butirrico   | 2 <sup>o</sup> /100            | +                          | + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100            | —                          |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                          | + acido citrico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                          |
| + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                          |   |                                |                            |

LWOFF per ottenere la crescita di tale organismo all'oscurità con fonti di azoto più semplici (sali d'ammonio e nitrati), sono stati vani.

*Nutrizione carbonata.* — Un alimento organico carbonato non è indispensabile allo sviluppo di *Chlamydomonas agloëformis* all'oscurità, infatti è stato possibile ad A. ed M. LWOFF di mantenere il ceppo per 10 passaggi successivi in un mezzo contenente asparagina più i componenti minerali necessari. Le colture che essi ottennero erano po-

vere, i flagellati molto piccoli, ma cionostante le colture furono trapiantabili in serie. In tale mezzo base all'asparagina l'aggiunta di acetato sodico al 2‰ diede luogo a colture più abbondanti e aventi uno sviluppo più rapido.

Parecchi acidi organici sono stati sperimentati, e di questi solo l'acido butirrico diede colture più abbondanti che le corrispondenti del controllo, ma meno numerose di quelle ottenute coll'acido acetico aggiunto allo stesso mezzo di base. Gli acidi succinico, tartarico, lattico, glicerosforico, malico e citrico non hanno dato colture più abbondanti del controllo e sono da considerarsi come inusufruibili. *Chlamydomonas agloëformis* non era stato incluso da LWOFF (1932) fra gli organismi oxiotrofi poichè la definizione da lui allora data richiedeva per tale gruppo fisiologico il carattere della indispensabilità di un alimento carbonato organico indipendente. È solo nel 1935 che *Chlamydomonas agloëformis* è entrato a far parte degli organismi *paraoxitrofi*, e più tardi, quando fu data una definizione più larga e comprensiva dell'oxitrofia, entrò a far parte degli *oxitrofi*.

I risultati ottenuti da A. e M. LWOFF con *Chlamydomonas agloëformis* riguardo il carattere altamente favorevole dell'acido acetico (oxitrofia), sono stati confermati ed estesi da LUCKSH ad altre *Chlamydomonadinae* coltivate all'oscurità: *Chlamydomonas pseudoagloë*, *Chlamydomonas monoica*, *Chlamydomonas dorsoventralis*, *Chlamydomonas subglobosa*, *Chlamydomonas pulchra*. Dato il numero delle specie fino ad ora studiate si può concludere che le *Chlamydomonadinae* a clorofilla sono oxiotrofe, cioè che esse danno colture notevolmente migliori del controllo quando, coltivate all'oscurità, si aggiunge al mezzo di coltura l'acido acetico (alimento organico carbonato).

#### **Polytoma uvella Ehremberg.**

*Caratteri morfologici.* — PASCHER nella sua monografia sulle *Phytomonadinae* (1927) ha descritto *Polytoma uvella* come un « Sammelart » in cui ha compreso un numero di forme a cui diede un nome specifico, senza però erigerle a specie. Infatti tutte queste forme presentano una grande somiglianza fra di loro e sono solamente distinguibili per alcuni caratteri vertenti il disegno del contorno dell'individuo e per altre piccole differenze. Giustamente PASCHER non ritenne validi tali caratteri differenziali presi da soli poichè le forme descritte ed osservate da lui e dagli altri come simili a *P. uvella* erano state trovate e studiate nel materiale naturale di raccolta ma non se ne era mai fatta alcuna coltura che permettesse di riconoscere come stabili tali caratteri.

È noto infatti che a seconda delle sostanze colturali contenute nei vari luoghi di raccolta è possibile trovare individui appartenenti alla stessa specie che si presentano sotto forme più snelle o sotto forme più tozze poichè hanno trovato condizioni diverse d'ambiente. PASCHER stesso ammise che uno studio morfologico sicuro, fatto su colture, avrebbe condotto a delimitare con precisione le varie forme e a definire la loro entità.

Noi abbiamo isolato otto ceppi di *Polytoma uvella* e due ceppi di *Polytoma obtusum* (PASCHER) e abbiamo avuto modo di confrontare e di seguire i caratteri morfologici di questi due tipi. Abbiamo notato che tali caratteri sono stabili ed in seguito a questo lavoro erigemmo con LWOFF (1937) tale tipo *obtusum* a specie. Nello stesso tempo potemmo precisare i caratteri morfologici che corrispondono alla specie *P. uvella*: corpo oviforme-ellissoidale, in molti individui arrotondato nella parte anteriore, meno arrotondato e cupoliforme nella parte posteriore, membrana netta ma non troppo ispessita, papilla membranosa ricoprente la papilla citoplasmatica da cui partono due flagelli lunghi da una volta a una volta e mezza il corpo; nucleo centrale o un po' sotto la linea mediana, stigma piuttosto piccolo ellissoidale o rotondo colorato dal carotinoide in bruno chiaro, (nei ceppi da noi studiati lo stigma non era visibile probabilmente per mancanza di carotinoide), due vacuoli contrattili nella parte anteriore, abbondante riserva figurata di amido in tutto il corpo specialmente nella parte posteriore, (i granuli di amido sono elittici-ovoidali); nelle colture vecchie abbondanti formazioni di gocce d'olio e presenza di un carotinoide giallo aranciato; divisione vegetativa in 2, 4, 8 cellule figlie; formazione di zigoti protetti da una grossa ed ispessita membrana e anche di zoozigospore. Abbiamo riscontrato che la presenza della papilla membranosa è costante per tutti i ceppi da noi studiati e che era necessario introdurre un nuovo concetto più obbiettivo nel valutare il contorno delle cellule appartenenti a questa specie. (vedi *Polytoma obtusum*).

*Storia.* — *Polytoma uvella* è stato isolato per la prima volta in coltura batteriologicamente pura da OGATA (1893) che fu anche il primo che abbia realizzato una coltura batteriologicamente pura di protozoi non parassiti. Egli adoperò brodo di carne glucosato a cui aggiunse un decotto di *Porphyra vulgaris* (alga). Egli potè coltivare *Polytoma uvella* per 5 mesi. Notò poi per primo che i *Polytoma* si possono sviluppare su mezzi solidi formando piccole colonie biancastre alla superficie di questo mezzo. JACOBSEN (1910) riuscì pure ad ottenere una coltura di *Polytoma uvella* e a mantenerla in vita durante parecchi passaggi in un liquido molto complesso, costituito da una soluzione sterilizzata di fibrina su cui

erano fatti previamente agire parecchi batteri di specie indeterminata. Queste due prime colture ottenute da OGATA e da JACOBSEN non potevano portare alcun chiarimento sul modo di nutrizione di questo leucofita. Spetta dunque a PRINGSHEIM il grande merito di avere per primo nel 1921 realizzato di nuovo la coltura pura di *Polytoma uvella* e di aver intrapreso ricerche minuziose e dettagliate sulla fisiologia di questa interessantissima specie. Egli ottenne la coltura pura partendo da un materiale infetto contenente sostanze organiche in putrefazione in cui si era sviluppata una buona coltura selvaggia di *Polytoma uvella*. Ottenuta la coltura batteriologicamente pura, egli incominciò a cercare di determinare le sostanze necessarie alla nutrizione di questo flagellato.

Partendo dalla prima coltura sviluppatasi a spese di sostanze proteiche previamente attaccate da batteri e sterilizzate in seguito, egli saggiò il potere nutritizio di parecchi aminoacidi trapiantando i *Polytoma* in mezzi contenenti tali aminoacidi a cui egli aggiungeva o no, del glucosio. Osservando però che le colture in tale mezzo nutritizio non riuscivano che molto povere, egli arrivò alla conclusione che forzatamente doveva esistere nelle prime colture impure realizzate su gelatina, una sostanza o un gruppo di sostanze originate dalla demolizione batterica che erano necessarie allo sviluppo di *Polytoma uvella*. Egli arrivò alla soluzione del problema facendo una serie di constatazioni e considerazioni biochimiche e citologiche. Sapendo che *Polytoma uvella* (e molti altri flagellati del tipo) ha una grande quantità di sostanze glucidiche di riserva, egli sospettò che fosse necessario un alimento organico carbonato che dovesse essere aggiunto al mezzo nutritizio da lui escogitato. Ora, nella gelatina in putrefazione, per opera di batteri proteolitici, si sviluppa un gran numero di aminoacidi fra cui la glicocolle è uno dei maggiori esponenti. Nel suo mezzo sintetico PRINGSHEIM aveva già messo della glicocolle; nonostante ciò non aveva ottenuto un abbondante sviluppo di flagellati; d'altra parte era facile supporre che tale aminoacido servisse alla sintesi dei costituenti proteici di *Polytoma uvella* e non a quella delle riserve amilacee. Egli pensò che la glicocolle desaminata (per opera dei batteri) si poteva trasformare in acido acetico. In seguito a questa serie di deduzioni egli, dopo alcune prove preliminari riuscì a mettere a punto un mezzo nutritizio in cui egli aveva riuniti l'acido acetico, la glicocolle, e il glucosio in parti eguali. Coltivando *Polytoma uvella* in questo mezzo nutritizio egli ottenne delle magnifiche colture. PRINGSHEIM osservò anche che se si eliminava l'acido acetico da questo mezzo, non si ottenevano che colture poverissime, mentre eliminando il glucosio e lasciando l'acido acetico, le colture diventavano perfettamente paragonabili a quelle in cui il glucosio era presente. In seguito PRINGSHEIM facendo variare i componenti azotati e carbonati, potè arrivare alle seguenti conclusioni: l'a-

cido acetico (sotto forma di sale) costituisce un nutrimento specifico per *Polytoma uvella* e può essere sostituito in questa sua azione dall'acido butirrico; il glucosio non può servire come alimento carbonato; le fonti d'azoto migliori sono gli aminoacidi, però *Polytoma uvella* può fare la sintesi dei propri costituenti citoplasmatici partendo da sali d'ammonio e da peptoni.

Più tardi la nutrizione di *Polytoma uvella* fu studiata da PRINGSHEIM e MAINX (1926) da PRINGSHEIM (1937) e da PROVASOLI (1937).

*Nutrizione azotata.* — PRINGSHEIM nel 1921 concludeva sulla possibilità dell'utilizzazione, come solo nutrimento azotato, dei sali d'ammonio. Più tardi lo stesso PRINGSHEIM (1937), riprendendo la sperimentazione delle fonti azotate per *Polytoma uvella* concluse che era necessaria l'aggiunta di un caramello di glucosio per ottenere la crescita in tale mezzo a base di acetato d'ammonio. (Il mezzo base di acetato di ammonio + i sali minerali necessari non dava luogo ad alcuna coltura) LWOFF e DUSI (1938) hanno ripreso la questione sperimentando col ceppo *Polytoma uvella* di PRINGSHEIM (stämme 1921) ed hanno composto il seguente mezzo nutritizio: acetato d'ammonio gr. 1; bifosfato potassico gr. 0,2; solfato di magnesio gr. 0,1; cloruro di potassio gr. 0,1; acqua distillata 1000 cc.<sup>3</sup>; idrato sodico *q. s.* per portare il pH a 7,5. A questo mezzo venivano aggiunti, dopo sterilizzazione, soluzioni di cloruro di calcio e di citrato di ferro o di cloruro ferrico, tali da dare una concentrazione finale rispettivamente di 1 p. 100.000 e 1 p. 100.000 — 1 p. 10.000.000.

Questi autori poterono coltivare *Polytoma uvella* durante 15 passaggi in questo mezzo ottenendo sempre ottime colture. Dimostrarono così che è inutile l'aggiunta di caramello di glucosio e che i risultati negativi ottenuti da PRINGSHEIM dipendono probabilmente dal fatto che il ferro aggiunto sotto forma di cloruro ferrico prima della sterilizzazione precipita (il mezzo adoperato da PRINGSHEIM è di pH 7,0) ed è quindi completamente inutilizzabile per i flagellati.

Inoltre i detti Autori hanno potuto dimostrare sperimentalmente che *Polytoma uvella* non ha bisogno di alcun fattore di crescita. Resta quindi assodato che *Polytoma uvella* può fare la sintesi delle sostanze proteiche partendo da sali d'ammonio qualora però siano presenti nel mezzo nutritizio sali opportuni di calcio e ferro ed una fonte carbonata organica (acido acetico).

*Nutrizione carbonata.* — PRINGSHEIM (1921) nelle conclusioni del suo primo lavoro sulla nutrizione di *Polytoma uvella* dice che l'acido formico (sotto forma di formiato d'ammonio) e gli acidi ossa-

lico, citrico, malico, tartarico o succinico sono inutilizzabili; che l'acido propionico dà dei risultati migliori e che l'acido butirrico può essere adoperato per ottenere delle buone colture. Più tardi PRINGSHEIM e MAINX (1926) danno una nuova lista dei composti organici carbonati che sarebbero utilizzati da *Polytoma uvella*. L'acido acetico e butirrico sono i più favorevoli; l'acido propionico e valerianico, « notevolmente meno favorevoli ». Gli acidi fumarico, eptilico, nonilico, palmitico, tricloroacetico, glicolico, lattico, gluconico, acrilico, oleico, benzoico, e gli alcool etilico e isobutilico si dimostrarono inutilizzabili.

Più tardi la nutrizione di *Polytoma uvella* è stata ripresa in esame da PRINGSHEIM (1937). In questo nuovo studio solamente gli acidi acetico, butirrico, lattico e succinico sono considerati come favorevoli, e gli acidi propionico, isobutirrico, valerianico, isovalerianico, caproico, malico, piruvico, ossalico, il diossiacetone, l'aldeide glicerica, la glicerina, il glicolo, l'acido glicolico, e l'alcool etilico, come inutilizzabili. Segnaliamo inoltre che nelle sue pubblicazioni PRINGSHEIM non ha mai dato il numero di flagellati sviluppatisi per mm.<sup>3</sup> nei vari mezzi colturali da lui sperimentati.

#### *Ricerche personali.*

*Origine dei ceppi.* — Abbiamo incominciato nel 1935 una serie di ricerche sulla fisiologia della specie *Polytoma uvella*. Noi potemo isolare sette ceppi differenti provenienti da materiali naturali prelevati in località varie:

ceppo n. 5 ottenuto da un terreno del giardino dell'Università di Portici (Napoli - Italia);

ceppo n. 6 da un terreno concimato di fresco di Kandersteg (Svizzera);

ceppo n. 7 proveniente da un terreno coltivato a patate di Kandersteg (Svizzera);

ceppo n. 9 ottenuto per isolamento di un solo individuo di una coltura in agar-asparagina-acetato, inviataci pura dal Dott. GIESBERG: coltura ottenuta direttamente da escrementi di porco, Delft (Olanda);

ceppo n. 13 ottenuto da un terreno di risaia di Casale Monferato (Italia);

ceppo n. 14 ottenuto da fango secco preso nelle vicinanze di Karkow (Russia) inviataci gentilmente dal Prof. KORSCHIKOFF;

ceppo n. 15 ottenuto da una coltura impura su agar, inviataci gentilmente dal Dott. P. MOEWUS (ceppo proveniente da una terra di Santiago del Chile).

Esclusione fatta del ceppo n. 9 (Delft) abbiamo ottenuto dal materiale citato, secondo il metodo sopra descritto, dapprima delle colture impure, dalle quali derivammo successivamente ceppi monofletici batteriologicamente puri per lavaggi ripetuti di un solo individuo. Il ceppo n. 9 inviatoci già in coltura batteriologicamente pura ha servito all'isolamento di un solo individuo dal quale derivò un ceppo monofletico. PRINGSHEIM, dietro nostra richiesta, ci ha gentilmente inviato il suo ceppo di *Polytoma uvella* (stämme 1921) con cui egli eseguì le prime ricerche.

In complesso avemmo quindi a disposizione otto ceppi, che, come abbiamo detto nella parte morfologica, appartengono tutti alla specie *Polytoma uvella sensu stricto*. Essi sono stati studiati morfologicamente in collaborazione con L. GRANDORI, e non si sono potute notare fra di essi differenze talmente cospicue da far pensare alla possibilità di distinguere diverse razze.

Il mezzo culturale adoperato è il *mezzo base al peptone di seta idrolizzata* (vedi parte « tecnica »).

*Reazione del mezzo nutrizio.* — Nostra prima cura è stata di verificare i limiti del pH entro i quali è possibile la coltura per ognuno dei ceppi in esperimento.

Come si potrà vedere dalla tabella aggiunta la zona pH comune a tutti questi ceppi è compresa fra pH-6 e pH-8,4. I ceppi n. 0 (Pringsheim) n. 5 (Portici), n. 6 (Kandersteg) e n. 13 (Casale) hanno in comune il limite nella zona acida potendosi infatti ottenere delle colture anche a pH - 5.

I ceppi n. 14 (Karkow), n. 15 (Santiago), danno colture a cominciare da pH - 5,5. Infine i ceppi n. 7 (Kandersteg), e n. 9 (Delft) si sviluppano in mezzi nutritizi da pH - 6 in avanti. Il pH dei mezzi culturali adoperati per tali ricerche è stato verificato dopo la sterilizzazione. PRINGSHEIM (1934-1937) sostiene che *Polytoma uvella* si può sviluppare solamente in mezzi basici cioè fra pH - 7,1 e pH - 8,4. Non sappiamo dare una spiegazione dei risultati da lui ottenuti poichè noi ottenemmo col ceppo da lui inviatoci (stämme 1921) direttamente una buona coltura nel periodo di quattro giorni in mezzi di differente pH, da pH - 5,4 fino a pH - 8,4. Noi partimmo da una coltura nel mezzo sopra citato a cui era stato aggiunto il 2‰ di acetato sodico avente pH - 7,8; la coltura era al massimo grado di sviluppo quando l'adoperammo per l'inoculo nella serie di tubi a pH differente. L'inoculo è stato di tre gocce, il mezzo in cui esperimentammo i vari pH era il mezzo base al peptone pancreatico + acetato sodico. Il massimo di coltura nel mezzo a pH - 5,0 fu ottenuto al contrario solamente dopo 18 giorni dall'inoculazione. Dato che tutti

i ceppi da noi studiati hanno una zona comune sufficientemente lata (fra pH 6 e pH - 8,4) noi possiamo concludere, contrariamente a PRINGSHEIM che *Polytoma uvella* può svilupparsi sia nella zona acida come in quella alcalina.

Polytoma uvella - Zona di pH. favorevoli

TABELLA 3.

| Mezzo nutritizio<br>(peptone 5 C. 4 <sup>0</sup> /100)<br>+ acetato | ceppo n. 0<br>E. C. Pringsheim<br>(stämme 1921) | ceppo n. 5<br>Portici<br>(Italia) | ceppo n. 6<br>Kandersteg<br>(Svizzera) | ceppo n. 7<br>Kandersteg<br>(Svizzera) | ceppo n. 9<br>Delft<br>(Olanda) | ceppo n. 13<br>Casale Monferr.<br>(Italia) | ceppo n. 14<br>Karkow<br>(Russia) | ceppo n. 15<br>Santiago<br>(Chili) |
|---|---|-----------------------------------|--|--|---------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| pH = 3,5  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 4,0  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 4,5  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 5,0  | ■   | ■                                 | ■                                      |  |                                 | ■  |                                   |                                    |
| pH = 5,5  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 6,0  |   |                                   |  | ■                                      | ■                               |  |                                   |                                    |
| pH = 6,5  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 7,0  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 7,5  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 8,0  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |
| pH = 8,5  |   |                                   |  |  |                                 |  |                                   |                                    |

N.B. — Le colonne indicano le zone di pH. in cui è stata possibile la coltura.

Determinata la zona comune ai vari ceppi dei valori di pH favorevoli, decidemmo di eseguire le nostre esperienze sui vari ceppi al pH costante di 7,4.

*Nutrizione carbonata.* — Tutte le prove eseguite per lo studio della fisiologia di questi otto ceppi furono condotte nelle stesse condizioni. Nel mezzo base al peptone di seta idrolizzata, noi ottenemmo coi vari ceppi sempre delle colture molto povere che però era possibile trapiantare in serie; attualmente noi siamo al trentesimo passaggio per tutti i ceppi. Lo sviluppo massimo ottenuto varia entro limiti strettissimi da ceppo a ceppo (17-25 flagellati per mm.<sup>3</sup>).

Aggiungendo acido acetico (acetato di sodio 2 ‰) si ottengono delle

colture ottime il cui punto massimo varia da ceppo a ceppo oscillando fra limiti che vanno da 1900 a 3500 flagellati per mm.<sup>3</sup>. Il *coefficiente di oxi-trofia* della specie *P. uvella* è in ogni caso superiore a 100.

Come vedremo più tardi nella comparazione delle specie, è questo il massimo valore constatato per il coefficiente di oxi-trofia finora calcolato per colture eseguite in peptone ed in tubi 16/160 mm. contenenti 10 cc. di liquido colturale, senza aereazione artificiale. Nella parte introduttiva noi abbiamo spiegato le ragioni per cui occorre delimitare le modalità di esperimento e mantenerle costanti per ottenere risultati comparabili. La prima serie di esperienze fatte su tutti i ceppi in condizioni uguali, comprendente 10 trapianti successivi in ogni mezzo in istudio, è stata fatta colle concentrazioni del 2 ‰ in volume per i seguenti acidi grassi: propionico, butirrico normale, isobutirrico, valerianico normale, lattico; del 2 ‰ in peso per gli acidi acetico e piruvico sotto forma di sali di sodio; del 0,2 ‰ in volume per l'acido caproico. I mezzi colturali così ottenuti venivano portati con idrato sodico a pH - 7,4 sterilizzati, ed il pH veniva riverificato dopo la sterilizzazione. La prima serie di esperienze fu eseguita adoperando acidi grassi della Ditta Merk. Fu in questa serie, durante l'esperimentazione, che ci accorgemmo della tossicità dell'acido caproico che inizialmente noi adoperammo alla concentrazione di 2 ‰, non ottenendo alcuna coltura. Non sapendoci spiegare questo fatto (a priori una sostanza che non è utilizzata e che non è tossica deve permettere una coltura almeno uguale a quella del controllo) eseguiamo una serie di concentrazioni decrescenti e ci arrestammo alla concentrazione di 0,2 ‰ che risultò essere la più favorevole per tutti i ceppi. Da queste prove risultò che la tossicità dell'acido caproico ha dei limiti quantitativi diversi a seconda del ceppo e precisamente ve ne sono alcuni più sensibili come per esempio i ceppi n. 5 e n. 7, per i quali il caproato è tossico alla concentrazione di 0,5 ‰, mentre a tale concentrazione i ceppi n. 6 e n. 9 danno delle ottime colture; il ceppo più resistente si è dimostrato essere il n. 9 il quale dà una buona coltura con una concentrazione in acido caproico dell'1 ‰. Non credemmo opportuno di modificare le concentrazioni adoperate per gli acidi acetico, butirrico e valerianico poichè nessuno di tali acidi dimostrò effetto tossico (colture abbondanti).

Eseguiamo al contrario prove di non tossicità per gli acidi propionico ed isobutirrico, che davano colture di poco superiori al controllo. Come si potrà notare nella tabella riassuntiva (n. 4), gli acidi acetico, butirrico, valerianico e caproico si dimostrarono essere altamente favorevoli. Facciamo notare però che i diversi ceppi rispondono con un diverso grado di aumento numerico di flagellati a questo effetto favorevole. Le maggiori differenze osservate sono quelle nell'acido valerianico

in cui il ceppo n. 14 diede una cifra massima di 500 flagellati per mm.<sup>3</sup>, mentre il ceppo n. 6 (risultato massimo osservato) diede 2750 flagellati per mm.<sup>3</sup>. Non abbiamo però creduto opportuno di tener conto del notevole valore assoluto di queste differenze mentre abbiamo dato importanza alla comparazione fra il comportamento numerico del ceppo coltivato in acidi grassi e quello del controllo; confrontando ad esempio l'effetto numerico prodotto dall'acido valerianico sul ceppo n. 14 (500 flagellati per mm.<sup>3</sup>) col controllo (20 flagellati per mm.<sup>3</sup>) si deve concludere che l'acido valerianico è altamente favorevole. Teniamo, a far

Polytoma uvella - Comparazione della nutrizione carbonata dei vari ceppi TAB. 4

| mezzo nutritizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | ceppo n. 0<br>E. G. Pringsheim<br>(stämme 1921) | ceppo n. 5<br>Portici<br>(Italia) | ceppo n. 6<br>Kandersteg<br>(Svizzera) | ceppo n. 7<br>Kandersteg<br>(Svizzera) | ceppo n. 9<br>Delft<br>(Olanda) | ceppo n. 13<br>Casale<br>Monferrato<br>(Italia) | ceppo n. 14<br>Karkow<br>(Russia) | ceppo n. 15<br>Santiago<br>(Chili) |
|--|-------------------------------|---|-----------------------------------|--|--|---------------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| senza acidi (controllo)  |                               | 17  | 20                                | 20                                     | 21                                     | 22                              | 25  | 22                                | 20                                 |
| + acido acetico  | 2 <sup>o</sup> /100           | 1900  | 3550                              | 2600                                   | 2000                                   | 2180                            | 3000  | 2250                              | 2500                               |
| + acido propionico   | 2 <sup>o</sup> /100           | 50  | 21                                | 50                                     | 46                                     | 46                              | 48  | 43                                | 27                                 |
| + acido butirrico  | 2 <sup>o</sup> ,00            | 2800  | 4330                              | 4500                                   | 3200                                   | 3000                            | 4200  | 3000                              | 3200                               |
| + acido isobutirrico   | 2 <sup>o</sup> /100           | 80  | 137                               | 121                                    | 104                                    | 132                             | 120   | 70                                | 80                                 |
| + acido valerianico  | 2 <sup>o</sup> /100           | 1800  | 2040                              | 2750                                   | 2300                                   | 900                             | 760   | 500                               | 850                                |
| + acido isovalerianico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | 60  | 50                                | 60                                     |  |                                 |   |                                   | 50                                 |
| + acido caproico   | 0,20 <sup>o</sup> /100        | 1500  | 1400                              | 1650                                   | 1000                                   | 1100                            | 1950  | 440                               | 1650                               |
| + acido isocaproico  | 0,20 <sup>o</sup> /100        | 500   | 430                               |  |  |                                 |   |                                   | 450                                |
| + acido eptilico   | 0,1 <sup>o</sup> /100         | 50  | 45                                |  |  |                                 |   |                                   | 45                                 |
| + acido octilico   | 0,1 <sup>o</sup> /100         | 250   | 270                               |  |  |                                 |   |                                   | 195                                |

rilevare che le differenze di numero ottenute per gli acido acetico e butirrico sono piuttosto dovute a deficienze sperimentali derivanti dalla difficoltà di sorprendere il punto massimo di moltiplicazione delle colture (Vedi tabella 1, parte tecnica). Come già rilevò ROTTIER, e noi confermiamo pienamente, dopo un periodo di attesa (*lag-fase*) la crescita si svolge logaritmicamente fino ad un punto massimo in cui permane per una durata di tempo molto breve; a tale fase logaritmica segue una produzione di zigoti ed una lisi (caduta brusca del numero dei flagellati) seguita da un aumento numerico, non logaritmico, che può raggiungere un secondo massimo parecchie volte più alto del primo. Anche questo massimo è di breve durata ed ad esso subentra una fase decrescente in

cui vi è una nuova formazione in massa di zigoti ed una lisi progressiva dei flagellati rimasti allo stadio vegetativo. Noi abbiamo creduto opportuno, per ragioni ovvie, di ritenere come valido ed imputabile alla composizione del mezzo nutritizio solamente il primo massimo, perchè il secondo avviene anche a spese delle sostanze proteiche liberate nel mezzo nutritizio dalla lisi dei flagellati. Dato il tempo estremamente breve di permanenza del numero dei flagellati a tale massimo, in molti casi, non ci è stato possibile sorprendere la crescita nel punto esatto in cui raggiungeva il valore massimo nonostante si siano eseguite le numerazioni ripetutamente su tubi diversi, in epoche diverse, ed a periodi distanziati di 6 in 6 ore. Con ciò si spiega l'apparente grande differenza esistente nelle cifre da noi date per i vari ceppi coltivati in tali acidi.

Successivamente noi eseguimmo un controllo per i ceppi n. 0, n. 5 e n. 15 adoperando acidi grassi FRAENKEL et LANDAU, di cui 3 sono sintetici, alle concentrazioni scalari che attualmente adoperiamo per lo studio della nutrizione carbonata, ed ottenemmo una perfetta corrispondenza di risultati nelle due serie.

Per questi tre ceppi estendemmo le ricerche agli acidi grassi seguenti: isovalerianico, isocaproico, eptilico ed octilico; i risultati ottenuti sono esposti nella tabella 4.

Gli acidi grassi più favorevoli per *Polytoma uvella* sono dunque: acido acetico, butirrico normale, valerianico normale, caproico normale, L'acido isocaproico può servire d'alimento carbonato organico (buone colture: 500-700 fl. per mm<sup>3</sup>).

L'acido octilico dà delle colture nettamente superiori al controllo (190-270 fl. per mm<sup>3</sup>) e si può considerare che dia un leggero effetto: così dicasi degli acidi isobutirrico e piruvico che danno luogo a colture meno abbondanti delle precedenti (rispettivamente 70-137 e 90-150 fl. per mm<sup>3</sup>). Gli acidi proprionico, isovalerianico ed eptilico permettono solamente delle colture povere, però superiori di circa il doppio a quelle ottenute nel controllo. Dallo studio comparativo eseguito su otto ceppi provenienti da località varie dell'Europa aventi clima ed altitudini differenti e su un ceppo americano, risulta che non è assurdo pensare che esista una stabilità fisiologica della specie. Vedremo più avanti che tale concetto è suffragato dai risultati ottenuti anche per altre specie su cui noi sperimentammo, e che, sia pure con un numero minore di ceppi, hanno rivelato sempre un'identità di comportamento fisiologico. Noi teniamo perciò come prototipo della specie *Polytoma uvella* il ceppo n. 0 che è quello isolato nel 1921 da PRINGSHEIM.

Come si può notare (vedi tabella 5) i nostri risultati sono molto differenti da quelli ottenuti da PRINGSHEIM. Ricordiamo che i nostri risultati sono stati controllati su due serie di cui la prima richiese quasi per tutti i ceppi 10 passaggi successivi in ognuna delle sostanze studiate,

che le numerazioni furono fatte almeno dopo sei passaggi, che i nostri risultati si sono dimostrati uguali per tutti i ceppi studiati, e che l'ultima serie fu fatta adoperando prodotti chimici fra i più puri esistenti attualmente (tre sintetici), infine che fra i ceppi studiati è incluso quello stesso che servì a PRINGSHEIM per i suoi studi.

Pensiamo dunque che la divergenza esistente fra i nostri risultati e quelli di PRINGSHEIM sia dovuta al fatto che egli non ha eseguito delle prove di non tossicità e che abbia quindi sperimentato con alcuni acidi a dosi tossiche.

Polytoma uvella (ceppo PRINGSHEIM)

TABELLA 5.

| mezzo nutrizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | concentrazioni<br>dell'autore |                                     |                          | L. Provasoli<br>1937-38 | mezzo nutrizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | concentrazioni<br>dell'autore          |                         |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------|
|  |                               | E. G. Pringsheim<br>1921      | E. G. Pringsheim<br>e F. Mainx 1926 | E. G. Pringsheim<br>1937 |                         |  |                               | Pringsheim 1921-37<br>Pring-Mainx 1926 | L. Provasoli<br>1937-38 |
| senza acidi (controllo)                                      |                               | —                             | —                                   | —                        | — 20                    | + acido isocaproico  | 0,2 <sup>o</sup> /100         |  | + 500                   |
| + acido acetico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                             | +                                   | +                        | ++ 1900                 | + acido eptilico   | 0,1 <sup>o</sup> /100         | —                                      | — 50                    |
| + acido propionico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                             | +                                   | 0                        | — 50                    | + acido octilico   | 0,1 <sup>o</sup> /100         |  | + 250                   |
| + acido butirrico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                             | +                                   | +                        | ++ 2800                 | + acido malico   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                                      | — 30                    |
| + acido isobutirrico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                               |                                     | 0                        | — 80                    | + acido lattico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                                      | — 30                    |
| + acido valerianico  | 2 <sup>o</sup> /100           |                               | +                                   | 0                        | ++ 1800                 | + acido piruvico   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                                      | + 150                   |
| + acido isovalerianico                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         |                               |                                     | 0                        | — 60                    | + acido succinico **   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                                      | — 30                    |
| + acido caproico *   | 0,2 <sup>o</sup> /100         |                               |                                     | +                        | ++ 1500                 | + alcool etilico   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                                      | — 30                    |

(\*) - Secondo E. G. Pringsheim in « Nature » - Gennaio 1937, è negativo (—); in « Planta, Arch. f. wissen. Bot. » Aprile 1937, l'acido caproico darebbe un leggero effetto favorevole.

\*\* - Secondo Pringsheim (1921) sarebbe negativo —.

In conclusione risulta dalle nostre esperienze che sono buone fonti carbonatate organiche per *Polytoma uvella* gli acidi acetico, butirrico, valerianico e caproico; gli acidi isocaproico ed octilico possono pure essere utilizzati, ma in proporzione molto minore; gli acidi piruvico ed isobutirrico danno solamente un leggero effetto. Sono male assimilati o inassimilabili gli acidi: propionico, isovalerianico, eptilico, malico, lattico, succinico, il glucosio, il levulosio, e gli alcool metilico, etilico, propilico, isopropilico e butilico.

*Polytoma uvella* è l'esempio di un organismo strettamente oxiotrofo, e come tale assimila bene una serie di acidi grassi inferiori (PROVASOLI 1937) il cui termine massimo è costituito da un acido a 8 atomi di carbonio, mentre non assimila gli zuccheri (PRINGSHEIM 1937) e non assimila gli alcool (PRINGSHEIM e PROVASOLI).

*Polytoma obtusum* (Pascher em. Lwoff e Provasoli)

Ceppo LWOFF

*Caratteri morfologici.* — Il ceppo di *Polytoma obtusum* da noi studiato in collaborazione con LWOFF è il ceppo isolato nel 1925 da LWOFF e studiato da lui sotto il nome di *Polytoma uvella*, ed è ugualmente sotto questo nome che fu impiegato da VOLKONSKY (1930) per il suo studio sul leucoplasto, e da ROTTIER nel 1936 per le curve di crescita.

Noi riprendemmo con LWOFF nel 1936 lo studio fisiologico di questo ceppo e constatammo la grande differenza fisiologica che lo distingueva nettamente dai ceppi di *Polytoma uvella* da noi isolati e da quello isolato da PRINGSHEIM.

Tali differenze erano non solo nettissime, ma così grandi che credemmo opportuno procedere ad un esame morfologico del ceppo LWOFF (1925) comparandolo coi ceppi di *Polytoma uvella*, sospettando che alle differenze fisiologiche corrispondessero differenze morfologiche. Lo studio morfologico ci portò alla conclusione che questo ceppo era riferibile a *Polytoma obtusum*, incorporato da PASCHER nel « Sammelart » *Polytoma uvella*. L. GRANDORI adoperò i nostri ceppi per uno studio più preciso di misurazioni biometriche che ci diedero la certezza della stabilità dei caratteri morfologici di *Polytoma obtusum*; accompagnandosi essi a caratteri fisiologici stabili decidemmo con LWOFF di erigere a specie il ceppo LWOFF. D'altra parte lo stesso PASCHER, che comprese nella specie *P. uvella* un certo numero di tipi, ammise « che essi potranno essere più tardi eretti a specie in seguito ad ulteriori studi ».

La definizione data dal PASCHER per *Polytoma obtusum* è la seguente: cellule ellissoidali fino a tozzamente oviformi, arrotondate nella parte anteriore fortemente arrotondate nella parte posteriore e larghe, m'embrana per lo più sottile sempre senza papilla, qualche volta colorate in gialliccio; flagelli lunghi circa come il corpo, stigma assente, granuli amidacei relativamente grossi, divisione sempre trasversale, cellule lunghe 12-18  $\mu$ , larghe 9-12  $\mu$ .

Il ceppo da noi studiato risponde ai caratteri *Polytoma obtusum* Pascher, tranne che in quello della papilla membranosa la quale, assente secondo PASCHER nella forma da lui studiata, è presente invece nel nostro ceppo.

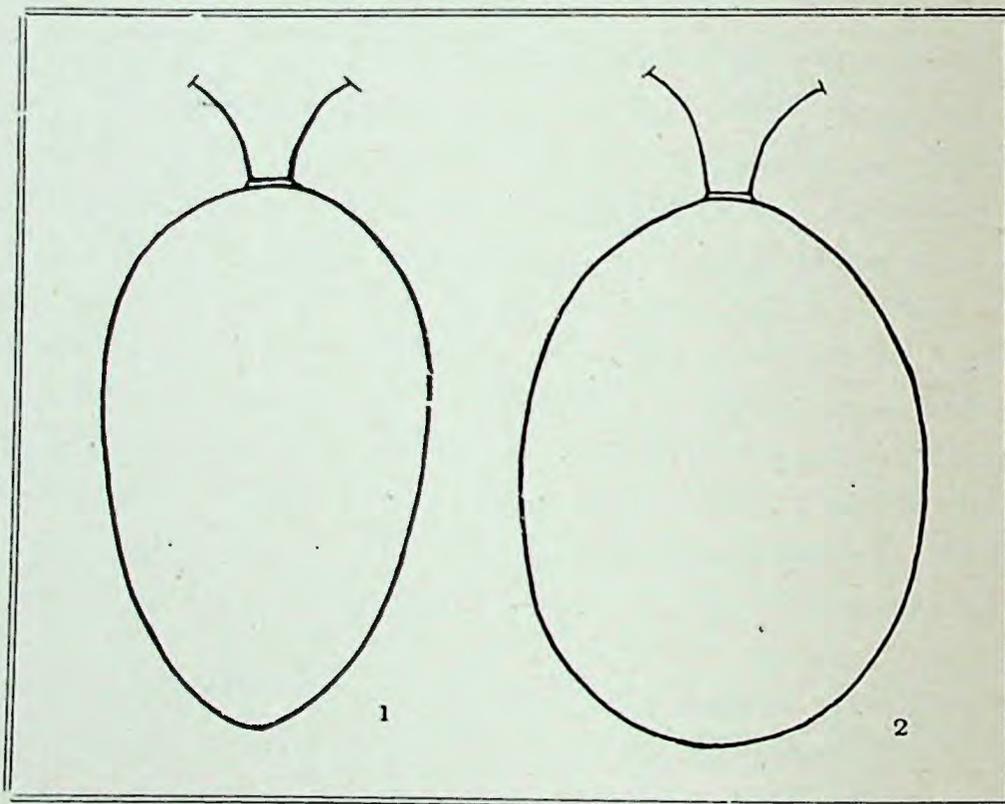
Tale papilla è del tipo di quella di *P. uvella* e ricopre la papilla protoplasmatica sempre nettamente visibile, come ebbe ad osservare VOLKONSKY. L'accertamento dell'esistenza della papilla membranosa in *Polytoma obtusum*, ceppo LWOFF, richiese accurate e lunghe osservazioni, perchè, data la sottigliezza della membrana, solo a fortissimo in-

grandimento e con appropriata illuminazione essa si è resa finalmente e distintamente visibile.

Rimandando ad altro lavoro la discussione sull'importanza della presenza della papilla membranosa quale carattere differenziale specifico, abbiamo creduto opportuno fare rientrare la nostra forma nella denominazione di *P. obtusum* PASCHER.

L. GRANDORI dal 1936 ha sottoposto i ceppi n. 1 e n. 10 e i ceppi di *P. uvella* da noi sperimentati, ad uno studio biometrico comparativo, basandosi sui diversi valori che assume nei vari individui dei diversi ceppi il rapporto fra diametro antero-posteriore e quello trasversale, considerando circolare o sub-circolare la sezione trasversale. L. GRANDORI

TABELLA 6.



1) contorno di *Polytoma uvella* (ceppo n. 7)  
2) contorno di *Polytoma obtusum* (ceppo Lwoff)

ha chiamato tale rapporto *indice di sfericità* ed ha compiuto le misurazioni su individui di diversi ceppi coltivati nello stesso mezzo colturale, in identiche condizioni fisiche e chimiche e quando le colture si trovavano in prossimità del massimo sviluppo numerico. Furono compiute misurazioni negli anni 1936-37-38. Il computo statistico dell'indice di sfericità ha permesso di stabilire che la differenza fra il valore medio dell'indice di sfericità dei vari ceppi di *Polytoma uvella* e quello dei due ceppi (n. 1 e n. 10 da noi determinati come *Polytoma obtusum*, è superiore sensibilmente a 3 volte il medio errore della loro differenza. Diamo il contorno di due individui medi: uno di *P. obtusum* ceppo LWOFF l'altro di *P. uvella*, ceppo n. 7.

Tale differenza permetterebbe però soltanto la distinzione di due razze diverse, e da sola non sarebbe sufficiente per servire di criterio alla distinzione di specie diverse; senonchè le differenze fisiologiche sono talmente nette da autorizzarci a fare assurgere *P. obtusum* alla dignità di specie distinta da *P. uvella*, tanto più che esseri così semplici e primitivi nella forma hanno differenze morfologiche specifiche piccole e difficilmente delimitabili.

*Reazione del mezzo nutritizio.* — Come già è stato fatto rilevare da LWOFF (1929-1932) e come risulta dalle nostre ricerche la zona di pH favorevole per la coltura di *Polytoma obtusum* è compresa fra  $\text{pH} = 7,2$  e  $\text{pH} = 8,4$ . (Il limite superiore non è stato determinato).

*Nutrizione azotata.* — LWOFF (1929-1932) ha studiato esaurientemente la nutrizione azotata di tale specie. *Polytoma obtusum* si sviluppa perfettamente in mezzi peptonati e in parecchi aminoacidi fra cui i migliori sono: l'asparagina, la glicocola, la cisteina, la glucosamina. In tali mezzi *Polytoma obtusum* dà delle colture povere ma trapiantabili in serie (un ceppo è mantenuto da 12 anni in un mezzo al peptone di seta idrolizzata senza alcuna aggiunta di acidi grassi). *Polytoma obtusum* può svilupparsi perfettamente in un mezzo avente come unica fonte di azoto un sale di ammonio, ma in tal caso è necessario che gli sia fornita una fonte carbonata organica indipendente (acido acetico) e la quantità necessaria di un sale di ferro. LWOFF e DUSI (1938) hanno ripetuto tale sperimentazione ed hanno potuto dimostrare che tale specie non ha bisogno di fattori di crescita, ma che ad essa è necessario fornire un sale di calcio e un sale di ferro che risultano indispensabili (tale aggiunta è fatta dopo la sterilizzazione affinché i sali rimangano in soluzione e siano assimilati da *Polytoma obtusum*).

*Nutrizione carbonata.* — Secondo LWOFF (1929-32) *Polytoma obtusum* assimila solamente l'acido acetico e l'acido butirrico; gli acidi propionico, isobutirrico, valerianico, caproico, octilico, nonilico, lattico, piruvico, glicerofosforico, ossalico, succinico, malico, tartarico, citrico e gli alcool metilico ed etilico, sono inutilizzabili. Il coefficiente di *oxitrofia* di *Polytoma obtusum* è di circa 100 in un mezzo peptonato senza aereazione artificiale.

Noi abbiamo ripreso una serie di ricerche in collaborazione con LWOFF (LWOFF e PROVASOLI 1937) che ci permettono di confermare pienamente tutti i risultati ottenuti precedentemente da LWOFF. Aggiun-

geremo che l'acido piruvico (sale di sodio) alla concentrazione di 2 ‰ ci diede un leggero effetto (191 flagellati per mm<sup>3</sup>) e confermiamo il risultato ottenuto da LWOFF (1935) che l'amido solubile (150 flagellati per

Polytoma obtusum (ceppo LWOFF)

TABELLA 7.

| mezzo nutritizio base<br>(peptone di seta 4‰) | concentrazioni<br>degli autori | A. Lwoff<br>1929-1932 | A. Lwoff<br>e<br>L. Provasoli<br>1937 | mezzo nutritizio base<br>(peptone di seta 4‰) | concentrazioni<br>degli autori | A. Lwoff<br>1929-1932 | A. Lwoff<br>e<br>L. Provasoli<br>1937 |
|---|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| senza acidi (controllo)                       |                                | —                     | — 25                                  | + acido isocaproico                           | 0,25‰                          |                       | — 25                                  |
| + acido acetico                               | 2‰                             | +                     | ++ 2600                               | + acido eptilico                              | 0,15‰                          | —                     | — 25                                  |
| + acido propionico                            | 1‰                             | —                     | — 30                                  | + acido octilico                              | 0,15‰                          | —                     | — 25                                  |
| + acido butirrico                             | 1‰                             | +                     | ++ 2800                               | + acido lattico                               | 2‰                             | —                     | — 34                                  |
| + acido isobutirrico                          | 1‰                             | —                     | — 66                                  | + acido piruvico                              | 2‰                             | —                     | + 190                                 |
| + acido valerianico                           | 0,5‰                           | —                     | — 30                                  | + acido succinico                             | 2‰                             | —                     | — 30                                  |
| + acido isovalerianico                        | 0,5‰                           |                       | — 20                                  | + amido solubile                              | 2‰                             | +*                    | + 150                                 |
| + acido caproico                              | 0,25‰                          | —                     | — 25                                  | + alcool etilico                              | 2‰                             | —                     | — 30                                  |

\* - A. Lwoff - 1925 - Annales Inst. Pasteur V. 53 pag. 641.

mm<sup>3</sup>) è leggermente favorevole. Dunque *Polytoma obtusum* è capace di utilizzare per la sua nutrizione solamente gli acidi acetico e butirrico, e gli altri acidi grassi, gli zuccheri e gli alcool sono inutilizzabili.

Ceppo PROVASOLI

*Ricerche personali.*

*Origine del ceppo.* — Noi abbiamo potuto isolare un ceppo da un terreno coltivato a piante ornamentali del giardino dell'Università di Delf (Olanda), ceppo che fisiologicamente si è dimostrato uguale al ceppo *Polytoma obtusum* di LWOFF. Morfologicamente tale ceppo si differenzia dal ceppo di Lwoff per lo spessore molto maggiore della membrana che rende molto più visibile che nel ceppo Lwoff la papilla membranosa. L'indice di sfericità misurato sul ceppo olandese è uguale a quello del ceppo LWOFF e si stacca quindi dal tipo *Polytoma uvella*.

*Reazione del mezzo nutritizio.* — Contrariamente al ceppo di LWOFF la zona di pH favorevole per il nostro ceppo in un mezzo peptonato all'acido acetico è compresa fra pH = 5,5 e pH = 8,4.

*Nutrizione azotata.* — Come il ceppo di LWOFF, il nostro ceppo può svilupparsi in un mezzo nutritizio contenente solamente dei peptoni o degli aminoacidi ai quali non è indispensabile aggiungere dell'acido acetico poichè le colture che se ne ottengono, benchè siano poverissime, sono trapiantabili in serie. Il nostro ceppo fu studiato in comparazione col ceppo LWOFF da LWOFF e DUSI (1938) che hanno potuto riscontrare come esso pure realizza la sintesi di tutti i propri componenti protoplasmatici in un mezzo all'acetato d'ammonio a cui sono stati aggiunti sali di calcio e di ferro.

*Nutrizione carbonata.* — Nel mezzo base al peptone di seta idrolizzata (HOFFMANN LA ROCHE) noi abbiamo ottenuto delle colture povere (28 flagellati per mm<sup>3</sup>) ma trapiantabili in serie.

Polytoma obtusum (ceppo PROVASOLI)

TABELLA 8.

| mezzo nutritizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1935-38 | mezzo nutritizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1935-38 |
|--|-------------------------------|-------------------------|--|-------------------------------|-------------------------|
| senza acidi (controllo)  |                               | — 28                    | + acido isocaproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 30                    |
| + acido acetico  | 2 <sup>o</sup> /100           | ++ 2500                 | + acido eptilico   | 0,15 <sup>o</sup> /100        | — 30                    |
| + acido propionico   | 1 <sup>o</sup> /100           | — 35                    | + acido octilico   | 0,15 <sup>o</sup> /100        | — 30                    |
| + acido butirrico  | 1 <sup>o</sup> /100           | ++ 3100                 | + acido lattico  | 2 <sup>o</sup> /100           | — 35                    |
| + acido isobutirrico   | 1 <sup>o</sup> /100           | — 60                    | + acido piruvico   | 2 <sup>o</sup> /100           | + 190                   |
| + acido valerianico  | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 35                    | + acido succinico  | 2 <sup>o</sup> /100           | — 30                    |
| + acido isovalerianico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 30                    | + amido solubile   | 2 <sup>o</sup> /100           | + 150                   |
| + acido caproico   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 35                    | + alcool etilico   | 2 <sup>o</sup> /100           | — 35                    |

L'aggiunta di acido acetico e di acido butirrico a tale mezzo base provoca delle colture abbondantissime (rispettivamente 2500 flagellati per mm<sup>3</sup> e 3100 flagettati per mm<sup>3</sup>).

Il *coefficiente di oxiotrofia* è dunque di circa 100 in un mezzo peptonato, senza aereazione artificiale. Il piruvato sodico e l'amido solubile hanno un leggero effetto sulla crescita di *Polytoma obtusum* (190 e 150 flagellati per mm.<sup>3</sup>). Gli acidi propionico, isobutirrico, valerianico, isovalerianico, caproico, isocaproico, eptilico, octilico, lattico, succinico e l'alcool etilico, sono inutilizzabili. Come si è potuto notare, il nostro ceppo si comporta fisiologicamente come il ceppo LWOFF. L'unica diffe-

renza è costituita dalla zona di pH favorevole che è molto più ristretta nel ceppo Lwoff (pH=7,2 —8,4) che nel nostro ceppo (pH=5,5 - 8,4). Abbiamo trovato una differenza consimile fra i vari ceppi della specie *Polytoma uvella* che si comportano in modo identico per tutti gli altri caratteri fisiologici. Rimarchiamo inoltre che anche in altri caratteri che ora esporremo i due ceppi di *Polytoma obtusum* hanno un comportamento identico e si differenziano dai ceppi di *Polytoma uvella*. È noto, da OGATA (1893), PRINGSHEIM (1921), che *Polytoma uvella* può essere coltivato in un mezzo solido come ad esempio in un mezzo all'agar-peptone-acetato. Ora noi abbiamo seminato ripetutamente tutti i nostri ceppi ed abbiamo sempre ottenuto delle colture che si sviluppano alla superficie (le semine sono fatte lasciando cadere una o due gocce di una coltura abbondante di *Polytoma*, sul piano inclinato a becco di flauto dell'agar contenuto in provette). I due ceppi di *Polytoma obtusum* seminati sullo stesso agar danno luogo sia a colture sulla superficie che a colture nell'interno dell'agar e fra l'agar e la parete di vetro; carattere questo che non abbiamo mai potuto riscontrare nelle colture parallele dei ceppi della specie *Polytoma uvella*.

*Adattamento.* — Quando riprendemmo con LWOFF (1936) lo studio fisiologico del suo ceppo di *Polytoma obtusum* noi constatammo con meraviglia che tale ceppo, che nel 1925 assimilava perfettamente l'acido butirrico, non ne era più capace.

Furono seminati allora dei tubi in cui oltre all'acido butirrico era contenuta una piccola percentuale di acido acetico (0,2‰). Dopo 60 giorni ottenemmo in tale mezzo una coltura normale ed abbondante; da questo tubo capostipite noi potemmo eseguire undici passaggi in un mezzo base + butirrato. Notiamo però che nel primo passaggio dal tubo capostipite (mezzo base butirrato + acetato) la coltura si sviluppò solo dopo 45 giorni; nel secondo passaggio il ritmo di sviluppo divenne completamente normale (6 giorni dall'inoculazione per raggiungere il punto massimo di sviluppo). Durante una delle serie di ricontrollo della fisiologia dei vari ceppi da noi studiati, ebbimo modo di constatare analogo fatto per il ceppo PROVASOLI di *Polytoma obtusum*. Tale ceppo isolato nel dicembre 1935 fu sempre intrattenuto (come facemmo notare nella parte tecnica) in un mezzo base sprovvisto di acidi grassi. La serie di ricontrollo, come noi sempre facemmo in tale caso, fu fatta inoculando una serie di tubi a cui erano aggiunti vari acidi grassi, partendo dal ceppo. La coltura di *Polytoma obtusum*, ceppo PROVASOLI, in acido butirrico, non si sviluppò che dopo 40 giorni circa. Ricordiamo che nelle esperienze fatte nel dicembre 1935 le colture in butirrato si erano svi-

luppate in 7 giorni. Il nostro ceppo aveva dunque perduto in due soli anni il potere di assimilare *direttamente* il butirrato.

Tale incapacità temporanea di usufruire l'acido butirrico per la sintesi, da parte di *Polytoma obtusum* dipende certamente dal fatto che i ceppi sono stati coltivati a lungo in assenza di acido butirrico; rimesso in presenza di questo, il ceppo attraversa evidentemente un periodo di adattamento, riprendendo lentamente la piena capacità d'usufruire l'acido butirrico; il che in altri termini significa che l'organismo produce l'enzima specifico che permette di usufruire per le sintesi l'acido butirrico, soltanto in presenza di questo. Questo fenomeno presentato dai due ceppi di *Polytoma obtusum*, trova riscontro in fenomeni molto simili in colture batteriche che, come è noto, permisero a KARSTRÖM di distinguere due serie di enzimi batterici: i *costitutivi*, che sono prodotti dai batteri anche quando le sostanze sulle quali agiscono non sono presenti nel mezzo colturale, e gli *adattativi* che sono prodotti dai batteri soltanto in presenza di una particolare sostanza.

L'importanza dei fenomeni da noi osservati in *Polytoma obtusum* ci spinse a riprendere l'argomento nel 1937-38 con una nuova serie di esperimenti tanto sul ceppo LWOFF come sul ceppo PROVASOLI. Risultò da questi che il periodo adattativo occorrente a *Polytoma obtusum*, ceppo LWOFF, per formare di nuovo l'enzima necessario all'assimilazione dell'acido butirrico è di 60 giorni, tanto quando il capostipite da cui si parte per l'inoculazione è una coltura sviluppatasi in acido acetico, come quando essa si sviluppa in un mezzo al butirrato + acetato (preso nella prima fase di crescita). Per il ceppo PROVASOLI di *Polytoma obtusum* tale periodo adattativo è di 27 giorni.

L'andamento delle colture adattative è il seguente: in un mezzo base peptonato + acido butirrico si ha un primo sviluppo corrispondente esattamente a quello che si può ottenere in un mezzo base sprovvisto di acido butirrico, cioè si raggiunge in breve tempo un massimo di 20-30 individui per  $\text{mm}^3$ , massimo in cui le colture rimangono stazionarie per una diecina di giorni; dopo tale periodo il numero dei flagellati diventa sempre minore, tanto che osservando al microscopio le colture nei tubi, non si vedono flagellati nel mezzo nutritizio. Questo periodo di regresso dura una trentina di giorni, e in seguito ad esso la coltura si sviluppa secondo l'andamento corrispondente a quello che si è descritto nella parte « tecnica » per un mezzo contenente acidi grassi. Il periodo adattativo è quello in cui la crescita è presumibilmente arrestata, in cui le cellule non si dividono ma restano in vita e vanno adattandosi a produrre l'enzima occorrente per assimilare l'acido butirrico. In mezzi colturali contenenti acido butirrico + acido acetico (0,2 ‰) si ha un primo sviluppo a spese della piccola quantità di acetato presente, seguito da

un arresto della crescita, da una caduta ad un numero di flagellati per mm.<sup>3</sup> corrispondente a quella osservata nell'altro mezzo (periodo adattativo) ed infine una crescita a spese dell'acido butirrico presente.

Inoltre ci è stato possibile ottenere delle colture in acido caproico partendo da colture previamente adattate all'acido butirrico; col ceppo LWOFF ottenemmo una coltura in caproato in 30 giorni inoculando due gocce. Se l'inoculo è più forte (3-5 gocce) si ottiene una coltura in 11 giorni. Col ceppo PROVASOLI, in identiche condizioni, si ottenne una coltura in acido caproico in 15 giorni; se invece si inoculano tubi di mezzo base + caproato, partendo da una coltura in acetato, si ottiene l'adattamento all'acido caproico in un periodo di tempo più lungo, periodo che è risultato di 69 giorni per il ceppo PROVASOLI e ancora più lungo per il ceppo LWOFF che attualmente, dopo 110 giorni dalla semina, non ha ancora dato alcuno sviluppo: ciò farebbe supporre che il passaggio in acido butirrico è altamente favorevole per l'adattamento all'acido caproico. Riassumendo: col ceppo PROVASOLI si ottengono colture in caproato partendo da butirrato in 15 giorni, e se si parte dall'acetato il massimo dello sviluppo è ottenuto in 69 giorni; per il ceppo LWOFF, se si parte dal butirrato, si ottengono colture in caproato dopo 30 giorni; partendo da un ceppo intrattenuto in acetato non si è ancora ottenuto alcuno sviluppo dopo 110 giorni. Può darsi che per il ceppo LWOFF sia assolutamente necessario l'adattamento al butirrato prima di poter ottenere un adattamento al caproato; ciò perchè il tempo di attesa in caproato, prolungandosi al di là dei 3 mesi, potrebbe essere dannoso ed impedire ogni ulteriore sviluppo. Le ricerche sono ancora attualmente in corso; però resta già fin d'ora dimostrata la possibilità, anche per i protozoi, di provocare il sorgere di nuovi enzimi attraverso un periodo di adattamento; è poi estremamente interessante il caso di questi due ceppi coi quali noi potemmo constatare sperimentalmente una perdita temporanea di uno degli enzimi e adattativamente farlo riacquistare.

Crediamo fermamente che col materiale che abbiamo a disposizione sarà possibile risolvere in avvenire alcuni degli importanti problemi riguardanti gli enzimi adattativi, problemi che non furono risolti fino ad oggi coi batteri poichè i periodi di adattamento per tali microorganismi sono estremamente corti (3-24 ore) e danno quindi luogo a difficoltà di sperimentazione e di valutazione dei risultati ottenuti. Ci riserviamo in altro capitolo di discutere più ampiamente sull'argomento.

*Polytoma caudatum* Korschikoff var. *astigmata* R. e L. Grandori

*Caratteri morfologici.* — Tale varietà è stata fondata da R. e L. GRANDORI, studiata morfologicamente da L. GRANDORI (1934) e descritta da tali Autori nel seguente modo: estremità non sempre appuntita, se lo è, non è foggiate ad appendice caudale bruscamente assottigliata, nucleo centrale o subcentrale, divisione cellulare nettamente trasversale in 2,4 o 8 cellule figlie, stigma mancante, lunghezza delle cellule 25-27  $\mu$ , flagelli lunghi da 1 volta a 1 volta e mezza la lunghezza del corpo, membrana sottile ma sempre nettamente visibile; il protoplasma sovente non aderisce alla membrana nella parte caudale; due vacuoli pulsatili anteriori; papilla citoplasmatica ricoperta da una papilla membranosa. Tale forma fu ritrovata in un terreno di brughiera (ceppo n. 2) concimato da 6 mesi e venne isolata da LWOFF e PROVASOLI (1935).

In seguito noi isolammo due ceppi di cui uno (ceppo n. 11) proveniente da un terreno coltivato nei dintorni di Zurigo, l'altro (ceppo n. 12) da un terreno a risaia di Casale Monferrato (Italia). Il ceppo n. 12 era stato da noi erroneamente determinato come *Polytoma dorsoventrale* e sotto tale nome esso appare nella nota da noi pubblicata sui risultati della nutrizione dei Protozoi (1937). Tale ceppo presentava in origine una leggera dorsoventralità; in seguito, dallo studio di comparazione sui vari ceppi da noi isolati, potemmo mettere in evidenza che anche *Polytoma caudatum* var. *astigmata* presenta alcune volte in coltura una dorsoventralità temporanea: inoltre lo studio morfologico del ceppo n. 12, fatto attraverso varie generazioni, ci ha convinti che anch'esso appartiene alla specie *Polytoma caudatum*.

*Reazione del mezzo nutritizio.* — Il ceppo n. 2 (LWOFF e PROVASOLI 1935) può svilupparsi perfettamente in mezzi aventi un pH compreso fra 5,5 e 8,4; i ceppi n. 11 e n. 12 possono anche svilupparsi a pH = 5,0, però in tale mezzo il ceppo n. 11 raggiunge il massimo sviluppo dopo 11 giorni e il ceppo n. 12 dopo 30 giorni. La zona comune dei tre ceppi da noi isolati è dunque compresa fra pH = 5,5 e pH = 8,4.

*Nutrizione azotata.* — I tre ceppi sono stati isolati colla tecnica descritta nella parte generale e sono tutti monofiletici. *Polytoma caudatum* var. *astigmata* si sviluppa bene in mezzi peptonati; anche con

peptone di seta si possono ottenere delle colture trapiantabili in serie. LWOFF e PROVASOLI (1935) concludevano che non si potevano ottenere delle colture in asparagina o in aminoacidi, anche se addizionati di acetato di sodio, che con uno sviluppo estremamente povero ed emisero l'ipotesi che « una sostanza determinata presente nei peptoni è indispensabile alla realizzazione di un'ottimo sviluppo ». LWOFF e DUSI (1937) riprendendo la nutrizione azotata di tale specie determinavano che la sostanza indispensabile a *Polytoma caudatum* var. *astigmata* è il tiazolo e che quando si aggiunga tale composto ad un mezzo all'asparagina acetato o all'acetato d'ammonio si ottengono delle ottime culture.

*Polytoma caudatum* var. *astigmata* può dunque assimilare un sale d'ammonio come solo nutrimento azotato quando siano presenti nel mezzo di coltura un alimento carbonato organico indipendente (acetato di sodio) ed un fattore di crescita (tiazolo). Il comportamento dei tre ceppi, a questo proposito, è identico.

*Nutrizione carbonata.* — Riportiamo qui i risultati ottenuti da LWOFF e PROVASOLI nelle loro ricerche sulla nutrizione carbonata di tale specie: in un mezzo base al peptone pancreatico si hanno delle culture molto povere ma trapiantabili in serie (35 fl. per mm.<sup>3</sup>), l'aggiunta di acetato sodico provoca delle colture abbondanti la cui densità è di 2350 flagellati per mm.<sup>3</sup>.

Il coefficiente di oxiotrofia di *Polytoma caudatum* var. *astigmata* in peptone pancreatico 5 C è dunque prossimo a 90. Se al posto di peptone di carne si adopera del peptone di seta idrolizzata, si hanno colture molto più povere (10 flag. per mm.<sup>3</sup>). L'aggiunta di acido acetico consente uno sviluppo abbondante (1000 flag. per mm.<sup>3</sup>). Il coefficiente di oxiotrofia nel peptone di seta idrolizzata è dunque di circa 100. LWOFF e PROVASOLI esperimentarono con parecchi acidi grassi che furono aggiunti alla concentrazione del 2 ‰ ad un mezzo colturale al peptone di seta idrolizzata: gli acidi propionico, butirrico normale e il piruvico, diedero delle colture nettamente superiori al controllo (fra 120 a 200 flag. per mm.<sup>3</sup>) ma molto inferiori, come si vede, a quelle date dall'acido acetico.

L'acido isobutirrico, valerianico, caproico e lattico vennero considerati da tali Autori come inutilizzabili. Più tardi noi riprendemmo le ricerche adoperando una serie di acidi grassi Fraenkel e Landau che furono aggiunti nelle proporzioni seguenti: propionico, butirrico, isobutirrico 1 ‰; valerianico, isovalerianico 0,5 ‰; caproico e isocaproico 0,2 ‰; eptilico ed octilico 0,1 ‰. Per tutti e tre i ceppi noi ottenemmo buone colture che si distanziavano nettamente dal controllo solamente per gli acidi acetico e butirrico. Alcuni altri acidi, come il caproico, isocaproico e l'octilico, danno luogo ad un leggero miglioramento nello svi-

luppo in rapporto al controllo, senza però essere nettamente favorevoli. L'acido propionico non ci ha dato più l'effetto positivo che noi avevamo osservato nel 1935.

Le esperienze fatte da noi in collaborazione con LWOFF sono state ripetute parecchie volte sempre con uguali risultati, però l'acido propionico del quale noi sperimentammo proveniva dalla Ditta Rhône-Poulenc; al contrario l'acido propionico con cui noi facemmo recentemente le esperienze di controllo è di origine sintetica (FRAENKEL e LANDAU).

Polytoma caudatum var. astigmata (ceppo LWOFF-PROVASOLI) TABELLA 9.

| mezzo nutrizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>degli autori | A. Lwoff<br>e L. Provasoli<br>1935 | L. Provasoli<br>1938 (*) | mezzo nutrizio base<br>(peptone di seta 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>degli autori | A. Lwoff<br>e L. Provasoli<br>1935 | L. Provasoli<br>1938 |
|--|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                                      |                                | — 10                               | —                        | + acido isocaproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100         |                                    | ++                   |
| + acido acetico  | 2 <sup>o</sup> /100            | ++ 1000                            | ++                       | + acido eptilico   | 0,1 <sup>o</sup> /100          |                                    | —                    |
| + acido propionico   | 2 <sup>o</sup> /100            | + 123                              | —                        | + acido octilico   | 0,1 <sup>o</sup> /100          |                                    | ++                   |
| + acido butirrico  | 2 <sup>o</sup> /100            | + 226                              | +                        | + acido lattico  | 2 <sup>o</sup> /100            | -- 20                              | —                    |
| + acido isobutirrico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                                  | —                        | + acido piruvico   | 2 <sup>o</sup> /100            | + 130                              | +                    |
| + acido valerianico  | 2 <sup>o</sup> /100            | —                                  | —                        | + alcool etilico   | 2 <sup>o</sup> /100            |                                    | —                    |
| + acido caproico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                                  | ++                       |  |                                |                                    |                      |

(\*) - (Per le concentrazioni adoperate da noi, vedi testo).

Di fronte a questo differente comportamento della specie *Polytoma caudatum* var. *astigmata* a distanza di tempo e in presenza degli stessi acidi, è possibile emettere due ipotesi: o l'acido propionico Rhône-Poulenc conteneva delle impurezze favorevoli alla crescita di *Polytoma caudatum* var. *astigmata*, oppure la specie è andata soggetta ad una perdita del potere di utilizzare l'acido propionico, comparabile al fenomeno osservato coll'acido butirrico per la specie *Polytoma obtusum*.

In conclusione *Polytoma caudatum* var. *astigmata* può fare la sintesi delle riserve glucidiche figurate, solamente partendo dall'acido acetico e butirrico; gli altri acidi grassi da noi sperimentati sono da considerarsi come inutilizzabili, come pure lo è l'alcool etilico.

*Polytoma ocellatum* Francé

*Caratteri morfologici.* — Tale specie nel complesso dei caratteri morfologici corrisponde a *Polytoma uvella* da cui si distingue per la presenza di tre vacuoli contrattili e di uno stigma relativamente grosso, di colore rosso che è fra i vacuoli pulsatili; flagelli lunghi quanto il corpo; lunghezza 24  $\mu$ ; larghezza 12  $\mu$ .

*Storia.* — La prima coltura batteriologicamente pura di *Polytoma ocellatum* è stata ottenuta da PRINGSHEIM (1936) che ne ha isolati due ceppi. Egli studiando questi due ceppi ritrovò che i loro caratteri fisiologici sono molto differenti. Secondo i suoi risultati i soli caratteri fisiologici in comune che esistono fra le due specie sarebbero: gli acidi acetico, isobutirrico, acetato di etile e diossiacetone sono utilizzabili dai due ceppi; gli acidi caproico, piruvico, l'alcool etilico e l'aldeide glicerica non sarebbero assimilati da nessuno dei due ceppi. Il ceppo n. 1 non assimila l'acido propionico che è assimilato dal ceppo n. 2, ma assimila gli acidi butirrico e valerianico, malico, lattico, succinico che non sono assimilati dal ceppo n. 2.

*Nutrizione azotata e fattori di crescita.* — PRINGSHEIM (1937) ha fatto lo studio della nutrizione carbonata di *Polytoma ocellatum* in un mezzo al peptone di carne e in questa sua nota non diede alcuna indicazione sulla nutrizione azotata di tale animale. I due ceppi che PRINGSHEIM gentilmente ci inviò, furono studiati da LWOFF e DUSI (1937) nei loro bisogni azotati; secondo questi Autori *Polytoma ocellatum* non si sviluppa che molto debolmente (da 1 a 8 flagellati per mm.<sup>3</sup>) in un mezzo all'asparagina naturale Roche, addizionata di acetato sodico. È necessaria l'aggiunta di tiazolo (4-metil-5  $\beta$  idroxi-etiltiazolo) per ottenere in tale mezzo una moltiplicazione abbondante di flagellati. Però l'aggiunta di tale fattore di crescita permette lo sviluppo di ottime colture di *Polytoma ocellatum* anche in un mezzo all'acetato d'ammonio e persino in un mezzo in cui la fonte azotata è costituita da nitrato di potassio (LWOFF e DUSI 1938). *Polytoma ocellatum* è dunque il primo esempio di un leocofita che utilizza un nitrato come unica fonte azotata, qualora però sia presente una fonte carbonata organica (acido acetico, alcool etilico) ed un fattore di crescita (tiazolo).

*Ricerche personali*

*Origine dei ceppi.* — Noi abbiamo utilizzato per le nostre ricerche, come LWOFF e DUSI, i ceppi n. 1 e n. 2 che ci furono inviati gentilmente da PRINGSHEIM.

*Reazione del mezzo di coltura.* — Ci siamo preoccupati, prima di incominciare gli esperimenti, di conoscere quale zona di pH era favorevole per i due ceppi ricevuti. Due serie di tubi a pH scalare furono seminati con tre gocce di una buona coltura in mezzo base peptonato + acetato con  $\text{pH} = 6,9$ . Il mezzo a differenti pH era pure costituito da una soluzione di peptone + acetato. Per il ceppo n. 1 ottenemmo direttamente in 5 giorni colture abbondantissime nei mezzi aventi pH compresi fra 5 e 8,4. A  $\text{pH} = 4,5$  ottenemmo il massimo sviluppo solamente dopo 9 giorni. Il ceppo n. 2 si comportò nell'identica maniera del ceppo n. 1, solamente nel mezzo a  $\text{pH} = 4,5$  si ottenne il massimo sviluppo in 7 giorni.

*Nutrizione carbonata.* — Le nostre esperienze sono state eseguite nel mezzo base al peptone pancreatico a  $\text{pH} = 6,9$ . Entrambi i ceppi danno delle buone colture in tale mezzo (260-270 flagellati per  $\text{mm.}^3$ ). L'aggiunta di acetato sodico (2 ‰) dà luogo ad un'ottima coltura (2300-3500 flagellati per  $\text{mm.}^3$ ). Il coefficiente di oxiotrofia nel mezzo suddetto, in tubi 16/160 mm. contenente 10 cc.<sup>3</sup> di mezzo nutritizio senza aereazione artificiale, è di 9 per il ceppo n. 1 e di 14 per il ceppo n. 2. Facciamo osservare che il coefficiente di oxiotrofia della specie *Polytoma ocellatum* è il più basso fin'ora osservato nel genere *Polytoma*. Abbiamo dimostrato come è stato riferito in una nota pubblicata, (PROVASOLI 1937) che i due ceppi inviatici gentilmente da PRINGSHEIM sono perfettamente identici nelle loro richieste fisiologiche per quanto riguarda la nutrizione carbonata. LWOFF e DUSI (1937-1938) hanno pure stabilito l'identità di tali due ceppi per quanto riguarda la nutrizione azotata. Le ricerche eseguite da noi nel 1937 su un certo numero di acidi grassi, sono state estese più tardi ad altri alimenti carbonati e la nuova serie di esperienze non ha fatto che confermare le nostre conclusioni di allora, cioè che i due ceppi hanno un comportamento fisiologico perfettamente identico: essi differiscono solamente nel grado di intensità di utilizzazione di determinati acidi organici. Ad esempio l'acido isobutirrico dà 670 flagellati per  $\text{mm.}^3$  per il ceppo n. 1, e 1550 per il ceppo n. 2; l'acido eptilico 850 contro 2000; l'octilico 1000 contro 2000; l'acido nonilico 970 contro 1370 (vedi Tabelle n. 10 e n. 11).

Analoghe differenze di grado di utilizzazione esistono pure fra i due ceppi per gli acidi decilico, laurìnico, miristico e malico. Però tali differenze nel grado di utilizzazione di determinati acidi organici da parte dei due ceppi, non sono tali, a nostro parere, da poter scindere nettamente come due razze fisiologiche distinte, un ceppo dall'altro. Comparando i nostri risultati con quelli di PRINGSHEIM si noterà una grande divergenza.

*Polytoma ocellatum* (ceppo PRINGSHEIM stämme 1) - Acidi grassi TABELLA 10.

| mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1937-38 | mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1937-38 |
|---|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|---|-------------------------------|-------------------------|
| senza acidi (controllo)                                   |                               | —                        | — 270                   | senza acidi (controllo)                                   |                               | — 270                   |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | ++ 2270                 | + acido isocaproico                                       | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 600                   |
| + acido propionico  | 1 <sup>o</sup> /100           | —                        | ++ 2700                 | + acido eptilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 850                   |
| + acido butirrico   | 1 <sup>o</sup> /100           | +                        | ++ 3350                 | + acido octilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 1000                  |
| + acido isobutirrico                                      | 1 <sup>o</sup> /100           | +                        | + 670                   | + acido nonilico  | 0,1 <sup>o</sup> /100         | + 970                   |
| + acido valerianico                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | +                        | ++ 1870                 | + acido decilico  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 740                   |
| + acido isovalerianico                                    | 0,5 <sup>o</sup> /100         |                          | — 420                   | + acido laurinicco  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 810                   |
| + acido caproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | —                        | ++ 1780                 | + acido miristico   | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 620                   |

Come abbiamo detto nella parte storica, PRINGSHEIM considera questi due ceppi come fisiologicamente differenti e le differenze da lui riscontrate sono realmente molto grandi. Noi confermiamo la possibilità per i due ceppi di assimilare gli acidi acetico e isobutirrico; ma d'altra parte noi troviamo che il ceppo n. 1 assimila perfettamente l'acido propionico (contrariamente a ciò che afferma PRINGSHEIM) e che il ceppo

*Polytoma ocellatum* (ceppo PRINGSHEIM - stämme 2) - Acidi grassi TABELLA 11.

| mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1937-38 | mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1937-38 |
|---|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|---|-------------------------------|-------------------------|
| senza acidi (controllo)                                   |                               | —                        | — 260                   | senza acidi (contr.)                                      |                               | — 260                   |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | ++ 3530                 | + acido isocaproico                                       | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 800                   |
| + acido propionico  | 1 <sup>o</sup> /100           | +                        | ++ 3100                 | + acido eptilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++ 2000                 |
| + acido butirrico   | 1 <sup>o</sup> /100           | —                        | ++ 4700                 | + acido octilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++ 2000                 |
| + acido isobutirrico                                      | 1 <sup>o</sup> /100           | +                        | + 1550                  | + acido nonilico  | 0,1 <sup>o</sup> /100         | + 1370                  |
| + acido valerianico                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | —                        | ++ 2600                 | + acido decilico  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 1370                  |
| + acido isovalerianico                                    | 0,5 <sup>o</sup> /100         |                          | + 550                   | + acido laurinicco  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 1120                  |
| + acido caproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | —                        | + 1500                  | + acido miristico   | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 562                   |

n. 2 dà ottime colture cogli acidi butirrico e valerianico, che secondo PRINGSHEIM non sono assimilabili. Per entrambi i ceppi noi riscontriamo che l'acido caproico è assimilabile mentre è inassimilabile secondo PRINGSHEIM; l'acido malico, che PRINGSHEIM considera assimilabile

*Polytoma ocellatum* (ceppo PRINGSHEIM - stämme 1) - Acidi e zuccheri - TAB. 12.

| mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                               | —                        | — 270                | + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | — 402                |
| + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | — 260                | + aldeide glicerica   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        |                      |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | + 1600               | + diossiacetone   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        |                      |
| + acido piruvico  | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        | + 960                | + glucosio  | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 300                |
| + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 210                | + levulosio   | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 310                |

per il ceppo n. 1 e inassimilabile per il ceppo n. 2, è per noi inusufruibile per tutti e due i ceppi (abbiamo osservato un leggero effetto di tale acido per il ceppo n. 2 che ha dato 400 flagellati per mm.<sup>3</sup> contro 260 del controllo). L'acido lattico secondo PRINGSHEIM ha un effetto posi-

*Polytoma ocellatum* (ceppo PRINGSHEIM stämme 2) - Acidi e zuccheri - TAB. 13.

| mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                               | —                        | — 260                | + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        | — 350                |
| + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        | — 400                | + aldeide glicerica   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        |                      |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        | ++ 1620              | + diossiacetone   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        |                      |
| + acido piruvico  | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        | + 1100               | + glucosio  | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 270                |
| + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 260                | + levulosio   | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 280                |

tivo per il ceppo n. 1 e negativo per il ceppo n. 2, per noi è utilizzabile per entrambi i ceppi, come pure lo è l'acido piruvico, considerato inutilizzabile da PRINGSHEIM. L'acido succinico è considerato da noi come inutilizzabile poichè nonostante abbia dato un leggero aumento delle cre-

scite (350-400 flagellati per mm.<sup>3</sup>), tale aumento non è neanche superiore al doppio degli individui contenuti nel controllo (inferiore ad una divisione cellulare).

L'alcool etilico è considerato negativo per ambedue i ceppi da PRINGSHEIM, mentre noi abbiamo ottenuto ottime colture (questo risultato venne citato da LWOFF e DUSI 1938).

Ci sono ignote le cause a cui sono dovute le differenze che PRINGSHEIM trova esistere fra i due ceppi da lui isolati. Forse esse vanno ricercate nella tecnica da lui impiegata in tali esperienze e nella provenienza e natura dei prodotti da lui adoperati.

D'altro canto noi possiamo dire che le nostre esperienze sono state ripetute almeno tre volte ottenendo sempre dei risultati costanti. Le sostanze che ci diedero risultati negativi furono sperimentate pure parecchie volte e facemmo per ciascuna di esse delle prove di non tossicità.

Abbiamo sperimentato con una serie di alcool su tutti e due i ceppi

*Polytoma ocellatum* (ceppo PRINGSHEIM - stämme 2) - Alcool - TABELLA 14.

| mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza alcool (controllo)                                    |                               | —                        | — 260                | + alcool butilico terz.                                     | 1 <sup>o</sup> /100           | — 453                |
| + alcool metilico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 302                | + alcool amilico  | 0,5 <sup>o</sup> /100         | + 600                |
| + alcool etilico  | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        | ++ 5150              | + alcool isoamilico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 462                |
| + alcool propilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | ++ 1700              | + alcool amilico sec.                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 306                |
| + alcool isopropilico                                       | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | — 460                | + alcool dimetiletilico                                     | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 375                |
| + alcool butilico   | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | ++ 4500              | + alcool esilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++ 2380              |
| + alcool isobutilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | + 1370               | + alcool dietiletilico                                      | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 377                |
| + alcool butilico sec.                                      | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | — 406                | + cicloesanol   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 273                |

ottenendo identici risultati che furono ricontrollati. Nelle nostre tabelle riportiamo solamente i risultati che furono ottenuti col ceppo n. 2 poichè solo per quello ritenemmo opportuno di eseguire le numerazioni. Noi consideriamo come altamente favorevoli gli alcool etilico, propilico, butilico ed esilico; come favorevole l'alcool isobutilico e come leggermente favorevole l'alcool amilico. Gli altri alcool, nelle condizioni ed alle concentrazioni in cui furono sperimentati non diedero alcun risultato che potesse considerarsi come favorevole.

Dato che non siamo assolutamente sicuri della purezza chimica di tutti questi alcool, ci riserviamo di riprendere queste sperimentazioni quando riusciremo a fornirci di una serie completa e pura.

Notammo che le colture di *Polytoma ocellatum*, contenenti alcool i cui corrispondenti acidi grassi non sono assimilati, avevano un forte odore di acidi grassi. Allestimo allora delle colture in grande, in un mezzo base peptonato cui aggiungemmo il 0,5‰ in acido isoamilico; incubammo a 23° le colture per 15 giorni: dopo questo periodo, previa filtrazione dei protozoi, il liquido fu analizzato e riscontrata la presenza di acido valerianico.

Non si è potuto per il momento, data la piccola quantità ottenuta, fare una analisi più precisa per accertare se tale acido fosse presente nella forma a catena dritta o diramata (acido isovalerianico).

Possiamo però dedurre che gli alcool sono ossidati ad acidi grassi e vengono poi assimilati di leucofiti come tali (PROVASOLI 1938).

Tale deduzione ci sembra giustificata anche perchè la maggior parte degli alcool corrispondenti ad acidi grassi assimilati, danno essi pure luogo ad abbondanti colture; fa eccezione l'alcool amilico che dà una leggera coltura di molto inferiore alla paragonabile coltura ottenuta coll'acido valerianico. Vedremo che tale mancato effetto dell'alcool amilico non solamente è stato riscontrato in *Polytoma ocellatum*, ma anche in altre specie; però prima di avanzare alcuna ipotesi in proposito, ci riserviamo di ritornare sull'argomento quando potremo sperimentare con sostanze sicuramente pure.

*Polytoma ocellatum* è fino ad ora la prima specie del genere *Polytoma* che è capace di assimilare un gran numero di acidi grassi anche a catena abbastanza lunga (laurinico); alcuni acidi organici e parecchi alcool; d'altra parte è il primo esempio di un leucofita che possa usufruire per la sua nutrizione azotata di un nitrato, ed esso è contemporaneamente l'organismo meno oxiotrofo finora isolato del genere *Polytoma*.

#### **Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille**

Secondo PASCHER i caratteri morfologici sono: cellule largamente oviformi od ellittiche, arrotondate alle due estremità; negli individui adulti manca la papilla membranosa, nei giovani è campaniforme; membrana staccata dal protoplasma; flagelli lunghi pressapoco come il corpo; cloroplasti piriformi con numerosi pirenoidi; stigma per lo più molto pallido, equatoriale o verso l'estremità anteriore; vacuoli contrattili superficiali e numerosi negli individui sviluppatisi in coltura.

Tale specie fu isolata in coltura batteriologicamente pura da MAINX



ed è stata studiata da A. ed M. LWOFF (1929-32). Secondo tali Autori che studiarono la fisiologia della nutrizione di *Haematococcus pluviialis*, all'oscurità, tale specie può realizzare la sintesi massima partendo da un aminoacido solo (asparagina o glicocola) e non può svilupparsi in mezzi che contengono come unica fonte azotata dei sali d'ammonio. Essi riconobbero che la presenza di un alimento organico carbonato non è indispensabile allo sviluppo di *Haematococcus pluviialis* però l'aggiunta di acido acetico e di acido butirrico al mezzo base alla asparagina, provocava culture abbondanti ed aventi un più rapido sviluppo.

Haematococcus pluviialis (ceppo MAINX)

TABELLA 15.

| Mezzo nutritizio base<br>(asparagina - 2 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>degli autori | A. e M. Lwoff<br>1929-32 | Mezzo nutritizio base<br>(asparagina - 2 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>degli autori | A. e M. Lwoff<br>1929-32 |
|---|--------------------------------|--------------------------|---|--------------------------------|--------------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                                | —                        | + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                        |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100            | ++                       | + acido glicerofosforico                                    | 2 <sup>o</sup> /100            | —                        |
| + acido butirrico   | 2 <sup>o</sup> /100            | +                        | + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100            | —                        |
| + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                        | + acido citrico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                        |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100            | —                        |   |                                |                          |

Gli acidi succinico, lattico, tartarico, glicerofosforico, malico e citrico non avrebbero alcuna influenza sullo sviluppo di *Haematococcus pluviialis*. Tale specie non fu dapprima inclusa negli organismi oxiotrofi, più tardi, quando nella definizione dell'oxitrofia furono compresi anche gli organismi per i quali un alimento organico carbonato non doveva essere assolutamente indispensabile, ma favorevole, *Haematococcus pluviialis* coltivato all'oscurità entrò a parte del gruppo degli oxiotrofi.

#### Chlorogonium euchlorum Ehremberg

*Caratteri morfologici.* — Questa specie possiede i seguenti caratteri morfologici: Cellule spesse, con parte posteriore per lo più non allungata e oviforme fino a fusiforme; con parte anteriore allungata e assottigliantesi fino a formare una sorta di becco trasparente, oppure fusiforme. Cromatoforo molto diffuso, difficilmente riconoscibile nella sua struttura, con tutta probabilità di forma piatta e spessa.

Stigma grosso rosso. Numerosi vacuoli contrattili sparsi nel protoplasma e numerosi pirenoidi nei cromatofori.

*Storia.* — La coltura batteriologicamente pura di *Chlorogonium euchlorum* è stata realizzata da PRINGSHEIM (1933) ed essa servì a LOEFER ed a LWOFF e DUSI per le loro esperienze. LOEFER e PRINGSHEIM (1934) mostrarono con ricerche eseguite indipendentemente che era possibile coltivare all'oscurità *Chlorogonium euchlorum*; tale specie non perde la propria clorofilla anche dopo una lunga permanenza al buio.

*Nutrizione azotata.* — Menzioniamo soltanto i risultati fino ad ora ottenuti dai vari Autori nello studio della nutrizione azotata. Le conclusioni di LOEFER, PRINGSHEIM, LWOFF e DUSI, sono in contraddizione fra di loro e il problema non è ancora stato risolto. Secondo LOEFER gli alimenti minerali azotati non sono sufficienti a *Chlorogonium euchlorum*. PRINGSHEIM dapprima concluse che tale specie poteva assimilare bene all'oscurità tanto i nitrati che i sali d'ammonio come soli alimenti azotati; in seguito egli riconobbe che essi potevano essere assimilati solamente in presenza di estratto di terra. Bisogna notare però che il solo estratto di terra è già un buon alimento azotato come fu già dimostrato per *Polytomella coeca*. (Vedi discussione su tale specie).

LWOFF e DUSI ottennero colture di *Chlorogonium euchlorum* all'oscurità solamente in peptone ed in asparagina. Attualmente tali Autori stanno compiendo una serie di ricerche per determinare i fattori di crescita necessari a *Chlorogonium euchlorum* e stanno per determinare finalmente il potere massimo di sintesi posseduto da tale specie nella nutrizione azotata.

*Reazione del mezzo nutritizio.* — Secondo LOEFER (1935) la zona di pH favorevole alla crescita di *Chlorogonium euchlorum* in un mezzo base al Bacto-triptone + acetato di sodio, sarebbe compresa fra pH 5,4 e pH 8,7.

*Nutrizione carbonata.* — La crescita di *Chlorogonium euchlorum* sarebbe secondo LOEFER (1934), accelerata dai seguenti acidi grassi: acetico, butirrico, isobutirrico e valerianico; gli acidi propionico e caproico darebbero dei risultati negativi. PRINGSHEIM (1935), LWOFF e DUSI (1935) confermarono l'utilizzazione dell'acido acetico da parte di *Chlorogonium euchlorum*. Secondo LWOFF, *Chlorogonium euchlorum*, possiederebbe un coefficiente di oxiotrofia di 12-13 nel pe-

ptone di carne 5 C. Vaillant. LWOFF e DUSI sperimentarono sullo stesso ceppo PRINGSHEIM che fu pure adoperato da LOEFER e conclusero che solo gli acidi acetico e piruvico potevano essere usufruiti da *Chlorogonium euchlorum* per la sua nutrizione carbonata. Per tali Autori gli acidi propionico, butirrico n., isobutirrico, valerianico n., e caproico n. sono inutilizzabili.

Chlorogonium euchlorum (ceppo PRINGSHEIM)

TABELLA 16.

| Mezzo nutritizio base   | concentrazioni *               | J. B. Loefer<br>1934 | A. Lwoff e<br>H. Dusi 1935 | E. G. Pringsheim<br>1937 | Mezzo nutritizio base | concentrazioni *               | A. Lwoff e<br>H. Dusi 1935 | J. B. Loefer<br>1935 | E. G. Pringsheim<br>1937 |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| senza acidi (controllo) |                                | - 13                 | - 32                       | -                        | + acido lattico       | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> |                            |                      | -                        |
| + acido acetico         | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | + 562                | + 400                      | +                        | + acido piruvico      | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | + 160                      |                      | -                        |
| + acido propionico      | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | 0                    | -                          | -                        | + acido succinico     | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> |                            |                      | +                        |
| + acido butirrico       | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | + 252                | -                          | -                        | + aldeide glicerica   | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> |                            |                      | -                        |
| + acido isobutirrico    | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | + 32                 | -                          | -                        | + diossiacetone       | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> |                            |                      | -                        |
| + acido valerianico     | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | + 63                 | -                          | -                        | + glucosio            | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | -                          | +                    | -                        |
| + acido caproico        | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | 0                    | -                          | -                        | + levulosio           | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | -                          | +                    | -                        |
| + acido malico          | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> |                      |                            | -                        | + alcool etilico      | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> |                            |                      | -                        |

\* - Concentrazioni alle quali Lwoff e Dusi e Pringsheim hanno sperimentato. J. B. Loefer ha lavorato col 3<sup>0</sup>/<sub>00</sub> per gli acidi grassi e 5<sup>0</sup>/<sub>00</sub> per gli zuccheri aggiunti ai mezzi base in parte organici e in parte inorganici. — Rimandiamo alla nota originale di questo Autore specialmente per i risultati ottenuti per gli zuccheri. (Arch. f. Protist. vol. 84, pag. 465).

Più tardi PRINGSHEIM (1937) in seguito a nuove esperienze, concluse confermando pienamente i risultati di LWOFF e DUSI per tutti gli acidi grassi utilizzati, ad eccezion fatta per l'acido piruvico che trova inutilizzabile e dell'acido succinico che per tale Autore è favorevole. LOEFER (1935) trovò che pure un certo numero di zuccheri era utilizzabile per la nutrizione carbonata di *Chlorogonium euchlorum*; tali risultati non furono confermati nè da LWOFF e DUSI nè da PRINGSHEIM. Ci sembra probabile che le conclusioni di LOEFER, sia sugli acidi grassi che sugli zuccheri, siano state completamente falsate dal fatto di aver fatto le numerazioni dei flagellati nei vari mezzi in esperimento dopo un numero di ore determinato e di non aver così potuto cogliere il punto massimo di crescita nei vari mezzi sperimentati (vedi in proposito le osservazioni fatte nella parte « Tecnica della sperimentazione » e « assimilazione degli zuccheri » per *Chilomonas paramoecium*).

*Chlorogonium elongatum* Dangeard

Tale specie si distingue da *Chlorogonium euchlorum* per i seguenti caratteri morfologici: cellule allungate fusiformi, da 9 a 15 volte più lunghe che larghe, appuntite alle due estremità; flagelli lunghi circa la metà del corpo; il cromatoforo lascia libere le due estremità e presenta due pirenoidi disposti simmetricamente rispetto al nucleo che è centrale. Stigma situato all'estremità del cromatoforo. Due vacuoli pulsanti.

Essa fu pure ottenuta in coltura batteriologicamente pura da PRINGSHEIM (1933) e il ceppo che ne derivò servì a LOEFER per le sue ricerche (1935). Secondo LOEFER la zona di pH favorevole a *Chlorogonium elongatum* in un mezzo base al Bacto-triptone + acetato è compresa fra pH 5,4 e pH 8,7.

*Chlorogonium elongatum* (ceppo PRINGSHEIM)

TABELLA 17.

| Mezzo nutritizio base<br>(triptone) | concentrazioni                 | J. B. Loefer<br>1935 | Mezzo nutritizio base<br>(triptone) | concentrazioni                 | J. B. Loefer<br>1935 |           |
|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------|
|                                     |                                | al buio              |                                     |                                | al buio              | alla luce |
| senza acidi (controllo)             |                                | — 8                  | senza zuccheri (contr.)             |                                | —                    | 8 59      |
| + acido acetico                     | 3 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | + 177                | + xilosio                           | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 8 84      |
| + acido propionico                  | 3 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | 0                    | + ramnosio                          | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 83        |
| + acido butirrico                   | 3 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | + 125                | + destrosio                         | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 8 84      |
| + acido isobutirrico                | 3 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | + 14                 | + galattosio                        | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 11 99     |
| + acido valerianico                 | 3 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | + 28                 | + levulosio                         | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 23 103    |
| + acido caproico                    | 3 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | 0                    | + maltosio                          | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 96        |
|                                     |                                |                      | + arabinosio                        | 5 <sup>o</sup> / <sub>00</sub> | +                    | 9 96      |

LOEFER ha studiato l'influenza di alcuni acidi grassi e zuccheri sulla nutrizione carbonata di tale specie che si può, come la precedente, coltivare all'oscurità. Noi non discuteremo i risultati di LOEFER poichè ad essi si applicano le riserve e le critiche che abbiamo già esposto per le ricerche da lui effettuate su *Chlorogonium euchlorum*. D'altra parte basta a tale proposito consultare i risultati ottenuti da questo Autore sperimentando all'oscurità ed alla luce coi vari zuccheri in rapporto a quelli ottenuti col controllo. Ricordiamo che i risultati alla luce non hanno alcun valore perchè fatti in presenza della funzione clorofilliana.

Non ci si sa quindi spiegare come egli abbia potuto considerare utilizzabili degli zuccheri che non diedero numericamente risultati nettamente superiori a quelli ottenuti nel controllo. Ci sembra in ogni caso certo che tale specie, come *Chlorogonium euchlorum* sia capace di svilupparsi all'oscurità e che gli acidi acetico e butirrico siano per essa buoni alimenti carbonati. Sarà opportuno anche per tale specie riprendere le sperimentazioni e delimitarne con precisione i caratteri trofici.

### Hyalogonium Klebsii Pascher

Secondo PRINGSHEIM il ceppo da lui isolato corrisponde a *Hyalogonium Klebsii* PASCHER: le cellule fusiformi allungate anteriormente in un becco sono lunghe da 40 a 60  $\mu$  e larghe 12  $\mu$ , le più giovani sono relativamente più sottili; estremità posteriore spesso allungata e

Hyalogonium Klebsii (ceppo PRINGSHEIM) TABELLA 18.

| Mezzo nutrizio base<br>(vedi testo) | concentrazioni                 | E. G. Pringsheim<br>1937 | Mezzo nutrizio base<br>(vedi testo) | concentrazioni                 | E. G. Pringsheim<br>1937 |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| senza acidi (controllo)             |                                | —                        | + acido malico                      | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        |
| + acido acetico                     | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | +                        | + acido lattico                     | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        |
| + acido propionico                  | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        | + acido piruvico                    | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        |
| + acido butirrico                   | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        | + acido succinico                   | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | +                        |
| + acido isobutirrico                | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        | + aldeide glicerica                 | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        |
| + acido valerianico                 | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        | + diossiacetone                     | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        |
| + acido caproico                    | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        | + alcool etilico                    | 2 <sup>0</sup> / <sub>00</sub> | —                        |

cilindriche. Flagelli lunghi circa la metà del corpo; due vacuoli anteriori contrattili. Stigma presente in forma di disco curvato più lungo che largo con una striscia mediana più intensamente colorata. Secondo PRINGSHEIM esso somiglia strettamente a *Chlorogonium euchlorum* anche per le divisioni vegetative.

Questa specie non è stata ottenuta fino ad oggi in coltura batteriologicamente pura che da PRINGSHEIM (1937) che ha pure accennati e modificati in parte i caratteri morfologici già osservati da PASCHER che fondò tale specie.

Il mezzo nutritizio adoperato da questo Autore per la cultura di *Hyalogonium Klebsii* è sufficientemente complesso: sarebbe necessaria la presenza, oltre ad un peptone, di estratto di lievito, estratto di terra e caramello di glucosio. La zona di pH favorevole sarebbe compresa fra pH 6,8 e pH 7,4.

Secondo PRINGSHEIM tale specie potrebbe solo assimilare gli acidi acetico e succinico: le altre sostanze da lui sperimentate (vedi tabella) si sono dimostrate inadatte alla nutrizione carbonata di *Hyalogonium Klebsii*. In conclusione *Hyalogonium Klebsii* presenta le stesse esigenze carbonatate che ha *Chlorogonium euchlorum* coltivato all'oscurità.

### *Polytomella coeca Pringsheim*

*Caratteri morfologici.* — I ceppi isolati indipendentemente da PRINGSHEIM (1934) e da LWOFF (1935) derivano da un ceppo clonico impuro proveniente dal laboratorio di KNIEP (Berlino) e furono studiati da questi due Autori sotto il nome di *Polytomella agilis*.

Più tardi PRINGSHEIM (1937) studiò morfologicamente il ceppo da lui isolato e ritrovò in esso una somma di caratteri morfologici che gli permisero di fondare una nuova specie: *Polytomella coeca*. Nella sua monografia in proposito si troverà una comparazione dei caratteri morfologici di *Polytomella coeca* colle altre specie della famiglia. Diremo in breve i caratteri morfologici che la distinguono.

Secondo PRINGSHEIM (1937) *Polytomella coeca* possiede cellule nude oviformi, appuntite posteriormente, lunghe 18-20  $\mu$ , larghe 10-12  $\mu$  che cambiano facilmente di forma; anteriormente con piccola ma distinta papilla tondeggianti, dalla cui base escono i quattro flagelli lunghi quanto il corpo; senza stigma visibile; zigoti a membrana ispessita, rotondi il cui diametro è di 10-12  $\mu$ . Granuli d'amido tondeggianti od oviformi.

*Storia.* — Come abbiamo detto più sopra questa specie è stata studiata da PRINGSHEIM (1934-35) e da LWOFF (1935) sotto il nome di *Polytomella agilis*; in seguito da PRINGSHEIM (1937) sotto il nome di *Polytomella coeca*, col quale nome d'ora in avanti verrà sempre chiamata.

*Nutrizione azotata.* — PRINGSHEIM (1934-35) asserì di aver coltivato *Polytomella coeca* in un mezzo sintetico in cui la sola fonte azotata era l'ammoniaca e la sola fonte carbonata l'acido acetico.

In seguito (1935) questo Autore ritornò sulla sua prima conclusione ed annunciò che *Polytomella coeca* si può sviluppare in acetato

d'ammonio solo se si aggiungono delle gocce di estratto di terra (senza tale aggiunta non si ottengono colture nel mezzo all'acetato d'ammonio). LWOFF e LEDERER (1935) confermarono l'impossibilità di ottenere colture nel mezzo all'acetato d'ammonio e la possibilità di ottenerle coll'aggiunta di estratto di terra, ma dimostrarono pure che in un mezzo sintetico all'acetato di sodio non contenente alcuna fonte azotata si potevano ottenere delle colture qualora si aggiungesse dell'estratto di terra. Questa esperienza dimostrava dunque che l'estratto di terra contiene oltre ad altre sostanze, una quantità di alimenti azotati necessari e sufficienti per permettere lo sviluppo di colture (10 passaggi in serie in tale mezzo). Questi Autori eseguirono delle esperienze comparative nei seguenti mezzi: acetato di sodio + estratto di terra; acetato d'ammonio + estratto di terra; acetato di sodio + nitrato di potassio + estratto di terra. Nei mezzi all'acetato di sodio + estratto di terra, e acetato di sodio + nitrato + estratto di terra, si ottennero uguali risultati (96 flagellati per mm.<sup>3</sup>); nel mezzo acetato d'ammonio + estratto di terra 194 flagellati per mm.<sup>3</sup>; essi conclusero che in presenza di estratto di terra *Polytomella coeca* è capace di assimilare i sali d'ammonio e non i nitrati.

PRINGSHEIM (1937) riuscì ad ottenere delle colture in un mezzo all'acetato di sodio, al caramello di glucosio e al cloruro d'ammonio: riesce difficile comprendere questo risultato, a meno di ammettere che egli abbia adoperato per le sue esperienze dei sali molto impuri, oppure che non abbia fatto passaggi in serie, oppure che pezzi di cotone dei tappi siano caduti nel mezzo nutritizio; infatti LWOFF e DUSI hanno dimostrato che due fattori di crescita sono necessari a *Polytomella coeca*: la pirimidina e il tiazolo: queste due sostanze o erano contenute nei sali adoperati, oppure provenivano dal cotone cardato dei tappi (si sa dopo il lavoro di SCHOPFER e RYTZ che il cotone cardato contiene effettivamente pirimidina e tiazolo).

*I fattori di crescita.* — PRINGSHEIM (1934) con esperienze di frazionamento e di assorbimento aveva concluso che le sostanze attive contenute negli estratti di terra erano gli acidi umici. Questa conclusione fu contraddetta da LWOFF e LEDERER (1935). In seguito LWOFF e DUSI (1937) riuscirono ad ottenere delle colture indefinite in un mezzo sintetico all'acetato d'ammonio a cui erano aggiunte la pirimidina ed il tiazolo. Questi Autori hanno pure confermato le conclusioni di LWOFF e LEDERER riguardo alla non utilizzazione dei nitrati.

*Reazione del mezzo nutritizio.* — Secondo PRINGSHEIM (1934) *Polytomella coeca* non si sviluppa che in mezzi nutritizi aventi un pH compreso fra pH = 5,3 e 6,5; tali risultati vennero da lui confermati più tardi (1935-1937).

LWOFF (1935) potè ottenere direttamente in un mezzo peptonato, colture di *Polytomella coeca* fra pH 4,5 e 8,4 (i limiti sono pH = 3,5 e pH = 9); questi risultati sono in contraddizione con quelli di PRINGSHEIM e noi abbiamo ripreso la questione: le nostre esperienze sono state eseguite in un mezzo base peptonato + acetato di sodio. Partendo da un mezzo a pH = 7 si ottengono direttamente senza alcuna difficoltà delle colture in mezzi a pH 4,5; partendo da pH = 4,5 si ottengono colture in mezzo a pH 3,5 (in tale mezzo il pH finale, cioè dopo che si sono sviluppati i flagellati, è di 4,2 poichè l'acido acetico a tale pH è un ottimo tampone).

Partendo da tale mezzo a pH = 4,2 è possibile ottenere direttamente colture a pH = 8,4 e 9,0: noi confermiamo dunque le conclusioni di LWOFF.

*Nutrizione carbonata.* — PRINGSHEIM (1935) asserì per primo che l'acido acetico è utilizzabile mentre il saccarosio ed il glucosio non lo sono. In seguito LWOFF (1935) confermò tali risultati e li estese trovando che oltre al saccarosio ed al glucosio, anche i seguenti zuccheri non sono utilizzabili: lattosio, galattosio, maltosio e levulosio. Questo Autore ha pure concluso che gli acidi propionico, butirrico, isobutirrico, valerianico, e caproico sono dei buoni alimenti carbonati, mentre gli acidi lattico e piruvico non sono utilizzati da *Polytomella coeca*. PRINGSHEIM (1937) confermò i risultati di LWOFF riguardo all'utilizzazione degli acidi propionico, butirrico, isobutirrico e valerianico e alla non utilizzazione dell'acido piruvico, però egli asserì essere l'acido caproico senza effetto (probabilmente perchè l'adoperò a dosi tossiche).

Questo Autore ha esteso inoltre lo studio ad altre sostanze: egli trovò che l'acido lattico, succinico, l'acetato di etile, il diossiacetone e l'alcool etilico sono buoni alimenti carbonati, mentre l'aldeide glicerica e gli acidi malico e isovalerianico sono inutilizzabili per *Polytomella coeca*.

#### *Ricerche personali.*

Le nostre ricerche sono state fatte col ceppo isolato da LWOFF (1935) nel mezzo base al peptone pancreatico a pH = 7,0.

In tale mezzo nutrizio *Polytomella coeca* dà delle colture di una densità di circa 180 flagellati per mm.<sup>3</sup>; l'aggiunta di acetato sodico al 2‰ dà delle colture abbondanti (1340 fl. per mm.<sup>3</sup>). Il coefficiente di *oxitrofia* di *Polytomella coeca* nel mezzo da noi adoperato, senza aereazione artificiale, è di 7.

Confermiamo le conclusioni di PRINGSHEIM (1935-1937) e di LWOFF (1935) per l'effetto favorevole degli acidi propionico, butirrico

e valerianico. L'acido isobutirrico non ci ha dato che un leggero aumento del numero dei flagellati (270 contro 180 fl. per mm.<sup>3</sup> del controllo); lo riteniamo perciò inutilizzabile. Questo risultato è in contraddizione coi risultati ottenuti dal LWOFF (1935) e da PRINGSHEIM (1937).

Polytomella coeca (ceppo LWOFF) - Acidi grassi

TABELLA 19.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>0</sup> /100) | concentrazioni dell'autore |               |                          | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>0</sup> /100) | concentrazioni dell'autore |                      |
|---|----------------------------|---------------|--------------------------|----------------------|---|----------------------------|----------------------|
|   | E. G. Pringsheim<br>1935   | A. Lwoff 1935 | E. G. Pringsheim<br>1937 |                      |   | E. G. Pringsheim<br>1935   | L. Provasoli<br>1938 |
| senza acidi (controllo)                                     | —                          | —             | —                        | — 180                | senza acidi (controllo)                                     | —                          | — 180                |
| + acido acetico   | 2 <sup>0</sup> /100        | +             | +                        | ++ 1340              | + acido isocaproico   | 0,25 <sup>0</sup> /100     | + 550                |
| + acido propionico  | 1 <sup>0</sup> /100        | +             | +                        | + 1015               | + acido eptilico  | 0,25 <sup>0</sup> /100     | + 1000               |
| + acido butirrico   | 1 <sup>0</sup> /100        | +             | +                        | ++ 1600              | + acido octilico  | 0,25 <sup>0</sup> /100     | + 1000               |
| + acido isobutirrico  | 1 <sup>0</sup> /100        | +             | +                        | — 265                | + acido nonilico  | 0,15 <sup>0</sup> /100     | + 700                |
| + acido valerianico   | 0,5 <sup>0</sup> /100      | +             | +                        | ++ 1280              | + acido decilico  | 0,07 <sup>0</sup> /100     | + 660                |
| + acido isovalerianico                                      | 0,5 <sup>0</sup> /100      | —             | —                        | — 210                | + acido laurinicco  | 0,07 <sup>0</sup> /100     | + 535                |
| + acido caproico  | 0,25 <sup>0</sup> /100     | +             | —                        | + 1015               | + acido miristico   | 0,07 <sup>0</sup> /100     | — 240                |

Ottenemmo ottime colture con l'acido caproico e in ciò confermiamo pienamente il risultato di LWOFF; tale acido dà risultati negativi a PRINGSHEIM e ciò probabilmente dipende dal fatto che egli lo avrà impiegato a concentrazione tossica. Come già l'aveva notato PRINGSHEIM

Polytomella coeca (ceppo LWOFF) - Acidi organici e zuccheri

TABELLA 20.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>0</sup> /100) | concentrazioni degli autori |                          |                          | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>0</sup> /100) | concentrazioni degli autori |               |                          |
|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|---|-----------------------------|---------------|--------------------------|
|   | A. Lwoff 1935               | E. G. Pringsheim<br>1937 | E. G. Pringsheim<br>1935 |                      |   | E. G. Pringsheim<br>1935    | A. Lwoff 1935 | E. G. Pringsheim<br>1937 |
| senza acidi (controllo)                                     | —                           | —                        | —                        | — 180                | + diossiacetone   | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | +                        |
| + acido malico  | 2 <sup>0</sup> /100         | —                        | —                        | — 120                | + saccarosio  | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | —                        |
| + acido lattico   | 2 <sup>0</sup> /100         | —                        | +                        | — 130                | + maltosio  | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | —                        |
| + acido piruvico  | 2 <sup>0</sup> /100         | —                        | —                        | — 302                | + levulosio   | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | —                        |
| + acido tartarico   | 2 <sup>0</sup> /100         | —                        | —                        | — 100                | + glucosio  | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | —                        |
| + acido succinico   | 2 <sup>0</sup> /100         | —                        | +                        | — 280                | + galattosio  | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | —                        |
| + aldeide glicerica   | 2 <sup>0</sup> /100         | —                        | —                        | —                    | + lattosio  | 2 <sup>0</sup> /100         | —             | —                        |

l'acido isovalerianico è inutilizzabile per *Polytomella coeca*. Abbiamo esteso le ricerche ad altri acidi grassi a catena più lunga di atomi di carbonio e concludiamo che gli acidi eptilico, octilico, nonilico e decilico sono favorevoli, che gli acidi isocaproico e laurinicico sono meno favorevoli ma nettamente utilizzabili; l'acido miristico non dà che una leggera crescita, che, in confronto al controllo, non è tale da poter giudicare come favorevole l'effetto di tale acido. Riguardo agli altri acidi organici già sperimentati dagli Autori che ci precedettero, noi possiamo confermare PRINGSHEIM per l'effetto negativo dell'acido malico, e LWOFF per la non utilizzazione dell'acido lattico. L'acido piruvico ci ha dato un

*Polytomella coeca* (Ceppo LWOFF) - Alcool

TABELLA 21.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza alcool (controllo)                                    |                               |                          | — 140                | + alcool butilico terz.                                     | 1 <sup>o</sup> /100           | — 116                |
| + alcool metilico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                          | — 123                | + alcool amilico  | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 69                 |
| + alcool etilico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | ++ 2135              | + alcool isoamilico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 93                 |
| + alcool propilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | ++ 1630              | + alcool amilico sec.                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 82                 |
| + alcool isopropilico                                       | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | — 104                | + alcool dimetiletilico                                     | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 118                |
| + alcool butilico   | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | ++ 1700              | + alcool esilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 900                |
| + alcool isobutilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | +                    | + alcool dietiletilico                                      | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 118                |
| + alcool butilico sec.                                      | 1 <sup>o</sup> /100           |                          | — 102                | + cicloesanolio   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 70                 |

leggero aumento delle colture, inferiore però al doppio del controllo: noi lo consideriamo quindi, con LWOFF e PRINGSHEIM, come inutilizzabile. Sono pure inutilizzabili gli acidi tartarico e succinico: l'acido succinico che è stato considerato come favorevole da PRINGSHEIM (1937) diede anche a noi un leggero miglioramento nel numero dei flagellati, non tale però da poter giustificare l'inclusione di tale acido fra i prodotti favorevoli. Abbiamo creduto opportuno di estendere anche per *Polytomella coeca* lo studio sull'effetto degli alcool: confermiamo PRINGSHEIM sull'azione grandemente favorevole dell'alcool etilico e aggiungiamo che gli alcool propilico, butilico, isobutilico, ed esilico sono pure favorevoli allo sviluppo di *Polytomella coeca*.

Al contrario non ottenemmo alcun aumento nella crescita con gli alcool metilico, isopropilico, butilico secondario, butilico terziario, ami-

lico, isoamilico, amilico secondario, dimetiletico, dietiletico e cicloesano, almeno alle concentrazioni da noi adoperate.

*Polytomella coeca* può dunque usufruire, per la sintesi delle sue sostanze amilacee di riserva, di un gran numero di acidi grassi anche a lunga catena di atomi di carbonio e di parecchi alcool.

### *Chilomonas paramoecium* Ehremberg

*Caratteri morfologici.* — Secondo PASCHER, la specie *Chilomonas paramoecium* è definita dai seguenti caratteri morfologici: corpo oblungo-cilindrico basalmente allungato ed arrotondato, spesso rivolto all'indietro, lungo da 20 a 40  $\mu$ ; due flagelli di cui uno lungo quanto il corpo, l'altro più corto, uscenti dall'apertura della faringe; estremità anteriore troncata obliquamente con un leggero incavo, che si prolunga nella faringe, la quale nella sua parte più profonda presenta una serie di granuli sferici (tricocisti rudimentali); granuli d'amido grossi, poliedrici, che riempiono talvolta tutto il corpo. Vacuolo unico posto anteriormente e dorsalmente.

*Storia.* — La prima coltura batteriologicamente pura di *Chilomonas paramoecium* fu ottenuta da GLASER e CORIA (1930) ed in seguito da LOEFER (1933-34). Più tardi LWOFF e DUSI (1934) ne isolavano pure un ceppo ed infine PRINGSHEIM (1937) ottenne in coltura pura un ceppo di *Chilomonas paramoecium* e due di *Chilomonas oblonga*.

*Nutrizione azotata.* — Noi non abbiamo menzionato fra le culture pure ottenute quella realizzata da MAST e PEACE poichè, come vedremo, si dubita che tali Autori abbiano realmente avuto *Chilomonas paramoecium* in una coltura batteriologicamente pura.

Secondo questi Autori *Chilomonas paramoecium* sarebbe capace di crescere in un mezzo completamente minerale totalmente sprovvisto di alimenti carbonati organici la cui sola fonte d'azoto sarebbe un sale di ammonio. MAST e PEACE conclusero che l'energia necessaria a questi flagellati sarebbe largamente se non interamente fornita dall'ossidazione del cloruro ammonico in nitrato; come fonte di carbonio sarebbe adoperata l'anidride carbonica atmosferica. Questo risultato non ha potuto essere confermato nè da LOEFER (1934) nè da LWOFF e DUSI (1934) nè da LOEFER e HALL (1936). LWOFF (1934) emise l'ipotesi che nelle colture di *Chilomonas* di MAST e PEACE esistesse in simbiosi un batterio chemiotrofo.

Infatti leggendo la memoria di MAST e PEACE si vede che essi non effettuarono nessuna prova batteriologica in mezzi che permettono

la coltura di tali batteri. È probabile dunque che le colture di tali Autori fossero infette da un batterio che forniva a *Chilomonas paramoecium* sostanze organiche oppure fattori di crescita. LWOFF e DUSI (1937-1938) riuscirono a dimostrare sperimentalmente che *Chilomonas paramoecium* è capace di utilizzare un sale d'ammonio come unico alimento azotato in presenza di una fonte carbonata organica (acido acetico), se però sono presenti nel mezzo colturale la pirimidina e il tiazolo. Nello stesso mezzo in cui manchino questi due componenti dell'a-neurina non si ottengono colture. Questi Autori insistono sul fatto che tracce minime di tali sostanze bastano a *Chilomonas paramoecium* e che tali tracce possono essere fornite dal cotone cardato che serve per i tappi dei tubi o dalla garza che serve per involgere tali tappi. Infatti LWOFF e DUSI per ottenere risultati regolari e valevoli nelle sperimentazioni, furono costretti, per *Chilomonas paramoecium*, a servirsi di un secondo tubo di vetro rovesciato e incapsulante il primo, eliminando così totalmente i tappi di cotone.

*Nutrizione carbonata.* — LOEFER (1934-35) considera come favorevoli gli acidi acetico, propionico, butirrico, isobutirrico e valerianico; con l'acido caproico non ottenne alcuna crescita. LWOFF e DUSI trovano ugualmente che l'acido acetico esercita un'azione favorevole ed aggiungono alle sostanze assimilabili gli acidi lattico, piruvico e l'amido solubile. Secondo PRINGSHEIM (1937) *Chilomonas paramoecium* utilizzerebbe solo gli acidi acetico e lattico, l'acetato d'etile, il diossiacetone e l'alcool etilico; gli acidi propionico, butirrico, isobutirrico, valerianico, caproico, malico, succinico e l'aldeide glicerica sarebbero completamente inusufruibili.

#### *Ricerche personali.*

Noi abbiamo utilizzato per le nostre ricerche il ceppo monofiletico isolato da LWOFF e DUSI. Secondo le ricerche di LOEFER (1935) *Chilomonas paramoecium* in un mezzo al bacto-triptone, si sviluppa a pH compreso fra 4,2 e 8,4; nello stesso mezzo, a cui è stato aggiunto dell'acetato di sodio, fra pH = 5,8 e pH = 8,4.

Abbiamo ripetute tali esperienze in un mezzo al peptone di carne a cui era stato aggiunto l'acetato sodico ed ottenemmo delle colture fra pH = 6,1 e pH = 8,4. Non abbiamo delimitato il limite inferiore, però possiamo aggiungere che non ottenemmo alcuna cultura in tale mezzo nutritizio avente pH = 5,4.

Confermiamo dunque le conclusioni di LOEFER in proposito. Le nostre esperienze sono state compiute nel mezzo base al peptone di carne (5C Vaillant) avente pH = 6,9. In tale mezzo *Chilomonas para-*

*moecium* dà una coltura di circa 135 flagellati per mm.<sup>3</sup>: l'aggiunta al mezzo di base di acetato sodico al 2<sup>o</sup>/<sub>100</sub>, provoca un arricchimento delle culture (480 fl. per mm.<sup>3</sup>).

Il *coefficiente di oxi-trofia* nel mezzo peptonato da noi utilizzato e in condizioni di non aereazione è di circa 3,5; il più basso fino ad ora osservato.

Confermiamo perciò LOEFER (1933), LWOFF e DUSI (1934), e PRINGSHEIM (1937) riguardo l'utilizzazione dell'acido acetico; confermiamo pure LOEFER sul carattere favorevole che hanno gli acidi butirrico e valerianico (contrariamente a ciò che asserisce PRINGSHEIM). L'a-

*Chilomonas paramoecium* (ceppo LWOFF) - Acidi grassi TABELLA 22.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> ) | concentrazioni<br>dell'autore      | J. B. Loefer<br>1933-1935 | A. Lwoff e H. Dusi<br>1935 | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> ) | concentrazioni<br>dell'autore      | L. Provasoli<br>1938 |
|--|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|--|------------------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)  |                                    | — 45                      | —                          | —                        | — 134                | senza acidi (controllo)  |                                    | — 134                |
| + acido acetico  | 2 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>    | + 332                     | +                          | +                        | + 480                | + acido isocaproico  | 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> | + 440                |
| + acido propionico   | 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>    | + 119                     |                            | —                        | — 190                | + acido eptilico   | 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> | + 210                |
| + acido butirrico  | 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>    | + 320                     |                            | —                        | ++ 805               | + acido octilico   | 0,15 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> | + 580                |
| + acido isobutirrico   | 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>    | + 70                      |                            | —                        | = 235                | + acido nonilico   | 0,15 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> | + 300                |
| + acido valerianico  | 0,5 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>  | + 317                     |                            | —                        | + 410                | + acido miristico  | 0,07 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> | + 264                |
| + acido isovalerianico   | 0,5 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>  |                           |                            |                          | + 320                |  |                                    |                      |
| + acido caproico   | 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> | 0                         |                            | —                        | + 530                |  |                                    |                      |

cido propionico ci ha date delle colture leggermente superiori al controllo e noi lo consideriamo, con PRINGSHEIM come inutilizzabile ed in ciò siamo in disaccordo con LOEFER; l'acido isobutirrico è considerato da noi come molto leggermente favorevole (≡: 235 flagellati per mm.<sup>3</sup> contro 134 del controllo): tale acido fu considerato da LOEFER come favorevole, e invece fu considerato inutilizzabile da PRINGSHEIM.

LOEFER e PRINGSHEIM ottennero risultati negativi con l'acido caproico poichè essi probabilmente lo impiegarono a concentrazioni tossiche; infatti noi ottenemmo con questo acido, a concentrazione del 0,25<sup>o</sup>/<sub>100</sub>, colture abbondanti anche superiori alle corrispondenti con acido acetico. Abbiamo esteso le ricerche ad altri acidi grassi a catena più lunga e consideriamo gli acidi isocaproico e octilico come favorevoli; gli

acidi nonilico e miristico come utilizzabili; l'acido eptilico non ci diede che delle colture leggermente superiori al controllo e noi le consideriamo perciò come leggermente favorevole. Abbiamo già fatto notare (PROVASOLI 1938) che *Chilomonas paramoecium* è particolarmente sensibile all'azione tossica degli acidi grassi aventi una catena più lunga di 6 atomi di carbonio: molte volte è difficile trovare una concentrazione alla quale l'effetto tossico sia eliminato ed in cui l'effetto favorevole si faccia sentire. Ottenemmo delle colture cogli acidi decilico e laurilico,

*Chilomonas paramoecium* ceppo (LWOFF) - Acidi organici e zuccheri TABELLA 23.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | J. B. Loefer<br>1935 | A. Lwoff e<br>H. Dusi - 1934 | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | A. Lwoff e<br>H. Dusi 1934 | J. B. Loefer<br>1935 |
|---|-------------------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|---|----------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                               | — 179                | —                            | —                        | — 125                | senza zuccheri (contr.)                                     |                            | — 179                |
| + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100           |                      | —                            | —                        | — 108                | + ramnosio  |                            | — 174                |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                      | +                            | +                        | + 400                | + destrosio   | 0                          | + 194                |
| + acido piruvico  | 2 <sup>o</sup> /100           |                      | +                            | —                        | + 570                | + galattosio  | 0                          | + 225                |
| + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                      | —                            | —                        | — 126                | + levulosio   | 0                          | + 228                |
| + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                      |                              | —                        | + 209                | + saccarosio  | 0                          | + 191                |
| + aldeide glicerica   |                               |                      |                              | —                        |                      | + maltosio  | 0                          | + 213                |
| + diossiacetone   |                               |                      |                              | +                        |                      | + lattosio  | 0                          | + 216                |
| + arabinosio  |                               | + 207                | 0                            |                          |                      | + amido solubile  | +                          | — 185                |
| + xilosio   |                               | + 185                | 0                            |                          |                      | + destrina  |                            | + 282                |

però ci fu impossibile fino ad ora di ottenere in maniera costante tali risultati.

Abbiamo pure sperimentato con altri acidi organici; confermiamo i risultati di LWOFF e DUSI per il carattere favorevole dell'acido lattico e piruvico e discordiamo da PRINGSHEIM a questo proposito poichè egli trovò l'acido piruvico inutilizzabile. Confermiamo PRINGSHEIM sulla inusufruibilità dell'acido malico, e LWOFF e DUSI sulla inassimilabilità dell'acido tartarico. L'acido succinico (non utilizzabile per PRINGSHEIM) ci ha dato un leggero sviluppo delle colture (209 fl. per mm.<sup>3</sup>, contro 125 del controllo), non tale però da giudicare tale acido come favorevole.

Anche per *Chilomonas paramoecium* noi abbiamo sperimentata una serie di alcool. LOEFER e HALL (1936) furono i primi a studiare per tale

specie l'alcool etilico, che essi trovarono senza effetto sulla moltiplicazione. PRINGSHEIM (1937) lo considera al contrario favorevole e noi confermiamo pienamente i risultati di questo Autore poichè ottenemmo abbondantissime culture (716 flagellati per mm.<sup>3</sup> contro 130 del controllo). Crediamo che il risultato discordante ottenuto da LOEFER e HALL dipenda dal fatto che questi Autori hanno osservato le colture solamente per un tempo brevissimo ed hanno fatto le numerazioni solo dopo 45 ore, (*Chilomonas paramoecium* nel mezzo di base all'alcool etilico si sviluppa molto lentamente).

Gli alcool butilico ed esilico sono favorevoli; gli alcool propilico e

*Chilomonas paramoecium* (ceppo LWOFF) - Alcool TABELLA 24.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | J. B. Loefer e<br>R. Hall - 1936 | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza alcool (controllo)                                    |                               |                                  |                          | — 130                | + alcool butilico terz.                                     | 1 <sup>o</sup> /100           | — 96                 |
| + alcool metilico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                                  |                          | — 92                 | + alcool amilico  | 0,5 <sup>o</sup> /100         | + 300                |
| + alcool etilico  | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                                | +                        | + 716                | + alcool isoamilico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 190                |
| + alcool propilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                                  |                          | + 337                | + alcool amilico sec.                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 124                |
| + alcool isopropilico                                       | 1 <sup>o</sup> /100           |                                  |                          | — 104                | + alcool dimetiletilico                                     | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 118                |
| + alcool butilico   | 1 <sup>o</sup> /100           |                                  |                          | + 658                | + alcool esilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 390                |
| + alcool isobutilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                                  |                          | + 237                | + alcool dietiletilico                                      | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 114                |
| + alcool butilico sec.                                      | 1 <sup>o</sup> /100           |                                  |                          | — 133                | + cicloesanolo  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 73                 |

amilico un po' meno favorevoli dei sopracitati; l'alcool isobutilico è utilizzato solo molto leggermente.

Consideriamo gli alcool metilico, isopropilico, butilico secondario, butilico terziario, isoamilico, amilico secondario, dimetiletilico, dietiletilico e cicloesanolo non utilizzabili come fonte carbonata organica, almeno alle concentrazioni da noi adoperate. (\*)

LWOFF e DUSI (1934) esperimentarono pure su parecchi zuccheri: glucosio, galattosio, levulosio, saccarosio, lattosio, maltosio, arabinosio, e xilosio.

Tali glucidi secondo questi Autori non sarebbero utilizzabili da *Chilomonas paramoecium* per la sintesi delle riserve carbonatate; al contrario

(\*) Vedasi osservazione fatta a proposito degli alcool per *Polytoma ocellalum* a pag. 51.

LOEFER (1935) concluse che la moltiplicazione di *Chilomonas paramoecium* era accelerata da parecchi zuccheri fra i quali cita (Ark. f. Protist. vol. 84, pag. 462) la destrina, il galattosio, levulosio, lattosio, l'arabinosio e il maltosio. LOEFER indica nei grafici delle sue tabelle il rapporto  $x/x_0$  corrispondente ai risultati osservati per ciascuno degli zuccheri sperimentati. Nel  $x/x_0$   $x$  rappresenta il numero dei flagellati riscontrato nei mezzi culturali dopo un numero determinato di ore a decorrere dall'inoculazione (*final count*), e  $x_0$  il numero dei flagellati riscontrato nei mezzi culturali subito dopo l'inoculazione (*initial count*). In base ai dati forniti da LOEFER nella sua pubblicazione noi abbiamo ricalcolato il numero reale dei protozoi presenti alla conta finale in ognuno dei mezzi sperimentati. Secondo le tabelle a pagina 467 del lavoro più sopra citato, xilosio, arabinosio e destrosio sono considerati da LOEFER come aventi una influenza sulla crescita di *Chilomonas paramoecium*; secondo il calcolo da noi fatto nel mezzo di base (controllo) la conta finale diede 179 fl. per mm.<sup>3</sup>, mentre nello stesso mezzo a cui fu aggiunto lo xilosio i flagellati erano 185 per mm.<sup>3</sup>, 207 in quello con l'arabinosio, 194 in quello col destrosio. Come si vede le differenze esistenti fra i mezzi contenenti zuccheri ed il controllo, sono estremamente deboli; d'altra parte facciamo osservare ancora una volta che LOEFER ha eseguito le conte dopo un numero di ore determinato e non si è curato di cogliere il punto massimo di sviluppo della coltura. Può quindi anche darsi che presi in un periodo determinato tali zuccheri abbiano influito sulla velocità di moltiplicazione ma è estremamente difficile poter concludere da esperienze condotte con tale tecnica, che gli zuccheri abbiano un reale effetto sulla crescita e che possano costituire degli alimenti carbonati per *Chilomonas paramoecium*. Noi pure abbiamo sperimentato col glucosio e il levulosio ad una concentrazione del 1,5‰ ed ottenemmo delle culture appena leggermente superiori a quelle del controllo. Concludiamo dunque sulla non utilizzazione degli zuccheri poichè le differenze in rapporto al controllo riscontrate da LOEFER e da noi sono estremamente piccole e possono essere dovute a impurezze.

### *Chilomonas oblonga* Pascher

Recentemente PRINGSHEIM (1937) ha isolato due ceppi di *Chilomonas oblonga*, data la brevità della nota in cui tali risultati sono esposti noi ci limitiamo, per ora, a riferire i dati da lui ottenuti.

Come si potrà notare dalla tabella acclusa i risultati ottenuti da PRINGSHEIM per i ceppi n. 1 e n. 2 sono fortemente diversi.

Ci permettiamo di avanzare il dubbio che o i due ceppi non appar-

tengono alla stesa specie, infatti il ceppo n. 1 di PRINGSHEIM è molto simile nella sua nutrizione carbonata al ceppo LWOFF di *Chilomonas paramoecium*, oppure se i due ceppi sono realmente appartenenti alla stessa specie, che i risultati ottenuti da PRINGSHEIM non siano esatti, come noi

Chilomonas oblonga - Risultati di E. G. PRINGSHEIM (1937) TABELLA 25.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C.) | Ceppo n. 1 | Ceppo n. 2 | Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C.) | Ceppo n. 1 | Ceppo n. 2 |
|---------------------------------------|------------|------------|---------------------------------------|------------|------------|
| senza acidi (controllo)               | —          | —          | + acido malico                        | —          | —          |
| + acido acetico                       | +          | +          | + acido lattico                       | —          | —          |
| + acido propionico                    | +          | —          | + acido piruvico                      | +          | —          |
| + acido butirrico                     | +          | —          | + acido succinico                     | +          | +          |
| + acido isobutirrico                  | +          | —          | + aldeide glicerica                   | —          | +          |
| + acido valerianico                   | +          | —          | + diossiacetone                       | +          | —          |
| + acido caproico                      | —          | —          | + alcool etilico                      | —          | +          |

abbiamo a riscontrare in egual caso per i ceppi n. 1 e n. 2 di *Polytoma ocellatum* che secondo PRINGSHEIM sono differenti e che noi potremmo dimostrare identici nella loro nutrizione carbonata.

### Euglena gracilis Klebs

*Caratteri morfologici.* — Secondo PASCHER tale specie possiede cellule vivacemente metaboliche, cilindriche allungate fino a ovali allungate, con estremità posteriore allungata in una breve punta; lunghe 37-45  $\mu$  e larghe 6-22  $\mu$ ; membrana striata spiralmente; flagello lungo come il corpo; cloroplasti numerosi a forma di disco a contorno lobato con pirenoidi a capsula.

*Storia.* — ZUMSTEIN (1900) ha mostrato per primo che era possibile coltivare in coltura batteriologicamente pura *Euglena gracilis* all'oscurità. Questo risultato fu ricontrrollato e confermato da TERNETZ (1912) da PRINGSHEIM (1912) da MAINX (1928) e da LWOFF e DUSI (1929). Tutti questi Autori che precedettero LWOFF e DUSI coltivarono *Euglena gracilis* all'oscurità in un mezzo peptonato a cui non veniva aggiunto alcun alimento carbonato organico.

LWOFF e DUSI (1929) hanno dunque il merito di aver pensato per primi ad aggiungere una fonte carbonata organica indipendente (acido acetico). In un mezzo al peptone pepsico poco idrolizzato di carne, essi poterono ottenere delle colture trapiantabili in serie ma abbastanza povere; l'aggiunta di acido acetico permetteva al contrario colture molto più abbondanti. Se per fonte azotata essi adoperavano un peptone molto più degradato, come un peptone pancreatico od un peptone di seta idrolizzata, tali Autori non ottenevano che poverissime colture: l'aggiunta di un alimento organico carbonato a tale mezzo era indispensabile per ottenere un forte sviluppo delle colture. La funzione di un alimento organico carbonato indipendente per una *Euglena* fu così messo in evidenza da tali Autori per la prima volta. LWOFF e DUSI (1931) studiarono l'effetto di un certo numero di acidi organici e di zuccheri (vedi tabella). Nel 1932 LWOFF incluse *Euglena gracilis* coltivata all'oscurità fra gli organismi oxiotrofi. LOEFER e HALL (1936) mostrarono che l'alcool etilico aveva un effetto accelerante sulla crescita di *Euglena gracilis* alla luce; infine E. G. PRINGSHEIM (1937) studiando la nutrizione carbonata di *Euglena gracilis* confermò completamente i risultati di LWOFF e DUSI sul bisogno e sulla utilizzazione di un alimento organico carbonato da parte di *Euglena gracilis* coltivata all'oscurità.

#### *Ricerche personali.*

Noi abbiamo utilizzato per le nostre ricerche il ceppo di *Euglena gracilis* isolato da PRINGSHEIM; tale ceppo fu coltivato da LWOFF e DUSI all'oscurità ininterrottamente dal Gennaio 1929 e deve essere considerato come un ceppo stabilizzato all'oscurità. Per tutto quanto riguarda la nutrizione azotata di tale ceppo alla luce e all'oscurità noi rimandiamo ai lavori di LWOFF e DUSI (1931 e 1933).

*Nutrizione carbonata.* — Le nostre esperienze sulla nutrizione carbonata di *Euglena gracilis* sono state compiute nel mezzo di base al peptone pancreatico di carne a  $\text{pH} = 6,9$ . Nel mezzo di base peptonato, come già fu notato da LWOFF e DUSI (1929), *Euglena gracilis* all'oscurità dà delle colture deboli (55 fl. per  $\text{mm.}^3$ ); nello stesso mezzo a cui sia stato aggiunto il 2<sup>o</sup>/<sub>100</sub> di acetato sodico si ottengono buone colture (440 fl. per  $\text{mm.}^3$ ). Il coefficiente di oxiotrofia per tale specie coltivata all'oscurità in un mezzo peptonato, senza aereazione artificiale, è dunque di 8.

Come si potrà notare dalla tabella noi confermiamo pienamente i risultati di LWOFF e DUSI (1931) e di PRINGSHEIM (1937) riguardo all'utilizzazione, come alimenti carbonati organici, degli acidi: acetico,

propionico, butirrico, valerianico e caproico. Già in una precedente nota (PROVASOLI 1938) noi concludemmo che l'acido isovalerianico ed eptilico sono senza effetto; che l'acido isocaproico dà un leggero incremento alla

*Euglena gracilis* (ceppo PRINGSHEIM) - Acidi grassi

TABELLA 26.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | A. Lwoff e<br>H. Dusi - 1931 |   | L. Provasoli<br>1937-1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | A. Lwoff e<br>H. Dusi - 1931 |   | L. Provasoli<br>1937-1938 |
|---|-------------------------------|------------------------------|---|---------------------------|---|-------------------------------|------------------------------|---|---------------------------|
|   |                               |                              |   |                           |   |                               |                              |   |                           |
| senza acidi (controllo)                                     |                               | —                            | — | — 55                      | senza acidi (controllo)                                     |                               | —                            | — | — 55                      |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100           | ++                           | + | ++ 440                    | + acido isocaproico   | 0,25 <sup>o</sup> /100        |                              |   | + 160                     |
| + acido propionico  | 1 <sup>o</sup> /100           | +                            | + | ++ 520                    | + acido eptilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | 0                            |   | — 64                      |
| + acido butirrico   | 1 <sup>o</sup> /100           | ++                           | + | ++ 550                    | + acido octilico  | 0,15 <sup>o</sup> /100        | 0                            |   | + 250                     |
| + acido isobutirrico  | 1 <sup>o</sup> /100           | —                            | — | — 77                      | + acido nonilico  | 0,08 <sup>o</sup> /100        |                              |   | + 176                     |
| + acido valerianico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | +                            | + | ++ 338                    | + acido decilico  | 0,07 <sup>o</sup> /100        |                              |   | + 209                     |
| + acido isovalerianico                                      | 0,5 <sup>o</sup> /100         |                              |   | — 60                      | + acido laurinicco  | 0,07 <sup>o</sup> /100        |                              |   | + 172                     |
| + acido caproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++                           | + | + 310                     | + acido miristico   | 0,07 <sup>o</sup> /100        |                              |   | + 136                     |

crescita e che l'acido octilico è favorevole. Aggiungiamo ora che gli acidi: nonilico, decilico, laurinicco sono nettamente utilizzati, e che l'acido miristico ha solo un leggero effetto.

*Euglena gracilis* (ceppo PRINGSHEIM) - Acidi organici e zuccheri

TABELLA 27.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | A. Lwoff e H. Dusi<br>1931 |   | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | A. Lwoff e H. Dusi<br>1931 |   | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|----------------------------|---|----------------------|---|-------------------------------|----------------------------|---|----------------------|
|   |                               |                            |   |                      |   |                               |                            |   |                      |
| senza acidi (controllo)                                     |                               | —                          | — | — 55                 | + acido citrico   | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          |   |                      |
| + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          | + | — 75                 | + acido glicerosfor.  | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          |   |                      |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          | — | ++ 400               | + diossiacetone   | 2 <sup>o</sup> /100           |                            | — |                      |
| + acido piruvico  | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          | — | ++ 385               | + aldeide glicerica   | 2 <sup>o</sup> /100           |                            | — |                      |
| + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          | + | — 70                 | + glucosio  | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          |   | — 75                 |
| + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          |   | — 70                 | + levulosio   | 2 <sup>o</sup> /100           | 0                          |   | — 75                 |

Noi confermiamo LWOFF e DUSI riguardo alla non utilizzazione degli acidi: malico, succinico e tartarico in opposizione a PRINGSHEIM che trova utilizzabili gli acidi malico e succinico; noi troviamo inoltre

che gli acidi lattico e piruvico sono altamente favorevoli per *Euglena gracilis* coltivata all'oscurità ed in ciò siamo in disaccordo con i risultati di LWOFF e DUSI e PRINGSHEIM; confermiamo al contrario i risultati negativi ottenuti da LWOFF e DUSI col glucosio e il levulosio.

LOEFER e HALL studiando l'effetto dell'alcool etilico su parecchi protozoi esperimentarono pure sul ceppo *Euglena gracilis* di PRINGSHEIM e conclusero che tale alcool può essere utilizzato da tale specie durante la crescita *alla luce*; essendo stata fatta tale esperienza alla luce, questo

*Euglena gracilis* (ceppo PRINGSHEIM) - Alcool

TABELLA 28.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | J. B. Loefer e<br>R. Hall 1936 | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza alcool (controllo)                                    |                               | —                              | —                        | — 55                 | + alcool butilico terz.                                     | 1 <sup>o</sup> /100           | — 74                 |
| + alcool metilico   | 2 <sup>o</sup> /100           |                                |                          | — 60                 | + alcool amilico  | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 60                 |
| + alcool etilico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                              | +                        | ++ 344               | + alcool isoamilico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 57                 |
| + alcool propilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                                |                          | ++ 334               | + alcool amilico sec.                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 73                 |
| + alcool isopropilico                                       | 1 <sup>o</sup> /100           |                                |                          | — 106                | + alcool dimetiletalico                                     | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 65                 |
| + alcool butilico   | 1 <sup>o</sup> /100           |                                |                          | ++ 345               | + alcool esilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++ 396               |
| + alcool isobutilico  | 1 <sup>o</sup> /100           |                                |                          | — 83                 | + alcool dietiletalico                                      | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 68                 |
| + alcool butilico sec.                                      | 1 <sup>o</sup> /100           |                                |                          | — 94                 | + cicloesanol   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 64                 |

risultato non è valevole. Spetta quindi a PRINGSHEIM (1937) l'aver per primo concluso che l'alcool etilico può essere utilizzato da *Euglena gracilis* all'oscurità come fonte carbonata organica.

Noi abbiamo sperimentato col medesimo ceppo PRINGSHEIM anche l'effetto di parecchi alcool e consideriamo come altamente favorevoli gli alcool etilico, propilico, butilico, ed esilico; l'alcool isopropilico dà anch'esso un leggero incremento allo sviluppo delle colture, inferiore però al doppio del controllo; così dicasi di tutti gli altri alcool esperimentati, che alle concentrazioni da noi adoperate e nelle condizioni in cui sperimentammo, non ci diedero alcun effetto che si potesse considerare positivo.

*Euglena gracilis* var. *urophora* Chadefaud-Provasoli

*Caratteri morfologici.* — Differisce dalla specie tipica *Euglena gracilis* per i seguenti caratteri: forma più affusolata; estremità caudale più accentuata e permanente; contenuto cellulare meno trasparente, molto più confuso; cloroplasti meno labili. Una descrizione dettagliata di questa varietà vien data in una nota (Chadefaud-Provasoli 1938) in corso di stampa.

*Ricerche personali.* — Questo ceppo fu trovato in una coltura bruta ottenuta con terreno di risaia delle vicinanze di Milano. La coltura batteriologicamente pura fu ottenuta con lavaggi successivi di un solo individuo (ceppo monofiletico). Tale ceppo fu da noi in un primo tempo creduto come appartenente al genere *Astasia*, poichè durante i primi mesi che noi l'avemmo in coltura, tale specie era completamente incolore; poi poco a poco incominciò a divenire verde. Facciamo notare che le colture erano tenute in cilindri di cartone alti quasi quanto i tubi, presentanti dei fori sui lati e posti in armadi a vetro, e potevano quindi andar soggetti, sia pure non direttamente, all'influenza della luce.

Tale ceppo fu studiato da DUSI (inedito) e risultò da tale studio ch'esso aveva perso completamente il potere di assimilare alla luce i sali d'ammonio e di richiedere invece amminoacidi o peptoni per la propria nutrizione azotata alla luce. Si differenzia quindi riguardo la nutrizione azotata alla luce, dal ceppo PRINGSHEIM di *Euglena gracilis* che è autotrofo.

Il mezzo nutritizio in cui noi compimmo tutte le nostre esperienze è il mezzo base al peptone pancreatico di carne (5 C. Vaillant).

Il ceppo che ha servito per le ricerche sulla nutrizione carbonata è stato sempre coltivato all'oscurità dal gennaio 1936: si può quindi considerare attualmente come un ceppo ormai stabilizzato a tali condizioni sperimentali. La zona di pH favorevole ad *Euglena gracilis* var. *urophora* è compreso fra  $\text{pH} = 4,5$  e  $\text{pH} = 8,4$ : si possono ottenere ottime colture direttamente a tali pH, seminando tre gocce provenienti da un ceppo coltivato in un mezzo base + acetato di  $\text{pH} = 7$  (i limiti estremi non sono stati determinati). Nel mezzo base al peptone pancreatico di carne, *Euglena gracilis* var. *urophora* dà delle colture povere (60 flagellati per  $\text{mm.}^3$ ); nello stesso mezzo a cui sia aggiunto dell'acetato di sodio al 2‰ si ottengono 435 fl. per  $\text{mm.}^3$ : il coefficiente di oxiotrofia è dunque di 7, per un mezzo al peptone pancreatico di carne senza aerazione artificiale, in tubi di 16 mm. per 160 mm. contenenti 10 cc<sup>3</sup> di liquido nutritizio.

Gli acidi propionico, butirrico, caproico, lattico e piruvico, come l'acido acetico, sono molto favorevoli; gli acidi isobutirrico, valerianico, eptilico ed octilico possono considerarsi come buoni alimenti carbonati

*Euglena gracilis* var. *urophora* (ceppo PROVASOLI) - Acidi grassi TABELLA 29.

| Mezzo nutrizione base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1937-1938 | Mezzo nutrizione base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1937-1938 |
|---|-------------------------------|---------------------------|---|-------------------------------|---------------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                               | — 60                      | + acido isocaproico   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 180                     |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100           | ++ 435                    | + acido eptilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 220                     |
| + acido propionico  | 1 <sup>o</sup> /100           | ++ 425                    | + acido octilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 310                     |
| + acido butirrico   | 1 <sup>o</sup> /100           | ++ 580                    | + acido nonilico  | 0,1 <sup>o</sup> /100         | + 175                     |
| + acido isobutirrico  | 1 <sup>o</sup> /100           | + 230                     | + acido decilico  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 154                     |
| + acido valerianico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | + 290                     | + acido laurico   | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 162                     |
| + acido isovalerianico                                      | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 115                     | + acido miristico   | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 159                     |
| + acido caproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++ 380                    |   |                               |                           |

organici; gli acidi isocaproico, nonilico, decilico, laurico e miristico, sono assimilati in proporzione minore; gli acidi isovalerianico, malico, tartarico, succinico e il glucosio e il levulosio, sono inutilizzabili.

*Euglena gracilis* var. *urophora* (ceppo PROVASOLI) - Acidi e zuccheri TABELLA 30.

| Mezzo nutrizione base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutrizione base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                               | — 60                 | + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100           | — 70                 |
| + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100           | — 70                 | + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100           | — 90                 |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100           | ++ 380               | + glucosio  | 2 <sup>o</sup> /100           | — 70                 |
| + acido piruvico  | 2 <sup>o</sup> /100           | + 330                | + levulosio   | 2 <sup>o</sup> /100           | — 75                 |

*Euglena gracilis* var. *urophora* può assimilare pure parecchi alcool: sono molto favorevoli gli alcool etilico e butilico, favorevoli gli alcool

propilico, isobutilico ed esilico; tutti gli altri alcool, per i campioni da noi sperimentati (vedi tabella), non ci hanno dato alcun risultato favorevole, almeno alle concentrazioni da noi impiegate.

*Euglena gracilis* var. *urophora* (ceppo PROVASOLI) - Alcool TABELLA 31.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza alcool (controllo)                                    |                               | — 60                 | + alcool butilico terz.                                     | 1 <sup>o</sup> /100           | — 55                 |
| + alcool metilico   | 2 <sup>o</sup> /100           | — 70                 | + alcool amilico  | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 60                 |
| + alcool etilico  | 2 <sup>o</sup> /100           | ++ 445               | + alcool isoamilico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 50                 |
| + alcool propilico  | 1 <sup>o</sup> /100           | + 340                | + alcool amilico sec.                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 60                 |
| + alcool isopropilico                                       | 1 <sup>o</sup> /100           | — 100                | + alcool dimetiletilico                                     | 0,5 <sup>o</sup> /100         | — 40                 |
| + alcool butilico   | 1 <sup>o</sup> /100           | ++ 495               | + alcool esilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 325                |
| + alcool isobutilico  | 1 <sup>o</sup> /100           | + 305                | + alcool dietiletilico                                      | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 90                 |
| + alcool butilico sec.                                      | 1 <sup>o</sup> /100           | — 85                 | + cicloesanolio   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | — 45                 |

*Comparazione con Euglena gracilis.* — Noi abbiamo visto che *Euglena gracilis* var. *urophora* presenta caratteri morfologici e fisiologici molto vicini ad *Euglena gracilis*: innanzi tutto sono due forme che si possono coltivare all'oscurità; ambedue perdono al buio la loro clorofilla; se riportate alla luce la riacquistano sintetizzandola; ambedue assimilano bene gli acidi: acetico, propionico, butirrico, valerianico, caproico, octilico, lattico e piruvico e gli alcool etilico, propilico, butilico ed esilico; esse assimilano meno bene gli acidi isocaproico, nonilico, decilico, laurinicco e miristico; nessuna delle due assimila gli acidi isovalerianico, malico, tartarico e succinico, il glucosio ed il levulosio. Le due forme presentano però, come abbiamo visto nella parte morfologica alcuni caratteri differenziali, e presentano pure nella nutrizione alcune differenze fisiologiche. Innanzi tutto nella nutrizione azotata alla luce si riscontra una differenza molto netta, essendo *Euglena gracilis* autotrofa mentre *Euglena gracilis* var. *urophora* non lo è; per la nutrizione carbonata le due specie differiscono tra loro poichè *Euglena gracilis* non assimila gli acidi isobutirrico ed etilico e l'alcool isobutilico che sono al contrario ben assimilati da *Euglena gracilis* var. *urophora*.

*Astasia Chattoni* Lwoff

*Caratteri morfologici.* — *Astasia Chattoni* fu per la prima volta descritta da LWOFF (1934); i caratteri morfologici da lui dati per tale specie sono: corpo allungato, lungo da 40 a 48  $\mu$ , largo da 11 a 13  $\mu$ , flagelli corti (circa 2/3 della lunghezza del corpo), lo stigma è assente e non si trova alcuna traccia di pigmento carotinoide là dove dovrebbe essere lo stigma; numerosi granuli di paramido di forma ovoide abbondanti specialmente nella estremità posteriore del corpo. PRINGSHEIM (1936) descrisse tale specie, senza essere stato a conoscenza del lavoro di LWOFF, sotto il nome di *Astasia longa*. I caratteri morfologici da lui dati corrispondono a quelli descritti da LWOFF e lo stesso PRINGSHEIM ha riconosciuto che le due descrizioni corrispondono alla stessa specie; è dunque dovere mantenere, secondo le regole della nomenclatura, il nome di *Astasia Chattoni*, che per priorità spetta a tale specie. Crediamo opportuno però di aggiungere alla descrizione morfologica alcuni caratteri osservati da PRINGSHEIM: corpo sottile, quasi a bastoncino, oppure ingrossato nella parte posteriore; parte anteriore tronca obliquamente; estremità posteriore che si assottiglia gradatamente in una breve punta, oppure tondeggiante. Cellule poco metaboliche, membrana liscia, flagello grosso, natrisforme, lungo circa la metà del corpo; stigma mancante; nucleo molto spostato verso l'estremità posteriore; granuli di paramido bastonciniiformi, ellissoidali o poliedrici.

Le misure date da PRINGSHEIM si avvicinano molto a quelle date da LWOFF pur essendo la specie studiata da PRINGSHEIM un po' più allungata: cellule lunghe da 55 a 60  $\mu$ , larghe 5  $\mu$ .

*Storia.* — Il ceppo isolato da LWOFF e DUSI (1934) proviene per isolamento di un solo individuo da una cultura bruta ottenuta da CHATTON seminando dell'acqua di stagno, dei dintorni di Banyuls-Sur-Mer, in un mezzo all'acqua più semi di grano. *Astasia Chattoni* può svilupparsi in mezzi contenenti peptone, anche se degradato come il peptone di seta idrolizzata. Nel mezzo base al peptone di seta si ottengono delle colture molto povere trapiantabili in serie (circa 18-30 fl. per  $\text{mm}^3$ ); se si aggiunge l'acido acetico al mezzo di base alla seta si ottengono delle colture abbondanti (240 fl. per  $\text{mm}^3$ ). LWOFF e DUSI (1936) hanno pure studiato l'effetto di parecchi acidi grassi e organici sulla nutrizione carbonata di *Astasia Chattoni*: gli acidi acetico, butirrico e caproico sono i più favorevoli; un po' meno favorevoli il propionico e il valerianico; l'acido isobutirrico diede solamente un piccolo arricchimento delle colture e fu considerato come leggermente favorevole; gli

acidi lattico e piruvico sarebbero pure utilizzati da tale organismo. PRINGSHEIM (1937) conferma i risultati di LWOFF riguardo agli acidi acetico, propionico, butirrico e isobutirrico; non ottenne però alcuna coltura nell'acido valerianico e nel caproico che egli, probabilmente, impiegò a concentrazioni tossiche. Per tale Autore gli acidi lattico e piruvico sono sprovvisti di azione (sono invece favorevoli per LWOFF e DUSI); e gli acidi malico, succinico, l'aldeide glicerica e l'alcool etilico sarebbero buone fonti organiche di carbonio.

*Ricerche personali.*

Abbiamo adoperato per le nostre ricerche il ceppo isolato da LWOFF e DUSI. Il mezzo nutritizio impiegato è il mezzo base al peptone pancreatico di carne (5 C Vaillant) a pH = 6,9. La zona di pH favorevole per tale specie è compresa fra pH = 5 e pH = 8,4; (non ottenemmo alcuna coltura in un mezzo a pH 4,5). In un mezzo base al peptone pancreatico

Astasia Chattoni (ceppo LWOFF e DUSI) - Acidi grassi TABELLA 32.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | A. Lwoff e<br>H. Dusì 1934-36 | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni<br>dell'autore | L. Provasoli<br>1938 |
|---|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                                     |                               | —                             | —                        | — 60                 | + acido isocaproico   | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 135                |
| + acido acetico   | 2 <sup>o</sup> /100           | ++                            | +                        | ++ 380               | + acido eptilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 370                |
| + acido propionico  | 1 <sup>o</sup> /100           | +                             | +                        | + 235                | + acido octilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | + 345                |
| + acido butirrico   | 1 <sup>o</sup> /100           | ++                            | +                        | ++ 550               | + acido nonilico  | 0,15 <sup>o</sup> /100        | + 235                |
| + acido isobutirrico  | 1 <sup>o</sup> /100           | +                             | +                        | + 120                | + acido decilico  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 169                |
| + acido valerianico   | 0,5 <sup>o</sup> /100         | +                             | —                        | ++ 380               | + acido laurinicco  | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 148                |
| + acido isovalerianico                                      | 0,5 <sup>o</sup> /100         |                               |                          | — 90                 | + acido miristico   | 0,07 <sup>o</sup> /100        | + 162                |
| + acido caproico  | 0,25 <sup>o</sup> /100        | ++                            | —                        | + 355                |   |                               |                      |

si ottiene una coltura debole (circa 60 fl. per mm.<sup>3</sup>); l'aggiunta di acido acetico a tale mezzo provoca un aumento molto netto nel numero dei flagellati (380 fl. per mm.<sup>3</sup>); il *coefficiente di oxiotrofia* è dunque secondo noi di 6, in un mezzo al peptone pancreatico senza aereazione artificiale in tubi di 16 mm. per 160 mm.

Possiamo confermare LWOFF e DUSI e PRINGSHEIM circa l'effetto favorevole che hanno gli acidi acetico, propionico e butirrico; confermiamo pure LWOFF e DUSI sull'effetto altamente favorevole degli acidi

valerianico e caproico contrariamente ai risultati ottenuti da PRINGSHEIM, che noi pensiamo abbia sperimentato tali acidi a concentrazioni troppo forti e tossiche.

Astasia Chattoni (ceppo LWOFF e DUSI) - Acidi organici e zuccheri TABELLA 33.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni dell'autore    |                          |   | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni dell'autore    |                          |                      |    |
|---|-------------------------------|--------------------------|---|----------------------|---|-------------------------------|--------------------------|----------------------|----|
|   | A. Lwoff e<br>H. Dusi 1934-36 | E. G. Pringsheim<br>1937 |   |                      |   | A. Lwoff e<br>H. Dusi 1934-36 | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 |    |
| senza acidi (controllo)                                   | —                             | —                        | — | 60                   | + acido succinico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | —                    | 60 |
| + acido malico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | — | 50                   | + aldeide glicerica                                       | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        |                      |    |
| + acido lattico   | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | — | 440                  | + diossiacetone   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        |                      |    |
| + acido piruvico  | 2 <sup>o</sup> /100           | +                        | — | 80                   | + glucosio  | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        |                      | 50 |
| + acido tartarico   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        |   | 65                   | + levulosio   | 2 <sup>o</sup> /100           | —                        |                      | 55 |

Abbiamo potuto coltivare *Astasia Chattoni* nel mezzo base al peptone a cui aggiungemmo acidi grassi a catena più lunga di sei atomi di

Astasia Chattoni (ceppo LWOFF e DUSI) - Alcool TABELLA 34.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni dell'autore |   | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> /100) | concentrazioni dell'autore |                      |     |
|---|----------------------------|---|----------------------|---|----------------------------|----------------------|-----|
|   | E. G. Pringsheim<br>1937   |   |                      |   |                            | L. Provasoli<br>1938 |     |
| senza alcool (controllo)                                  |                            |   | —                    | + alcool butilico terz.                                   | 1 <sup>o</sup> /100        | —                    | 55  |
| + alcool metilico   | 2 <sup>o</sup> /100        |   | —                    | + alcool amilico  | 0,5 <sup>o</sup> /100      | —                    | 90  |
| + alcool etilico  | 2 <sup>o</sup> /100        | + | ++                   | + alcool isoamilico                                       | 0,5 <sup>o</sup> /100      | —                    | 60  |
| + alcool propilico  | 1 <sup>o</sup> /100        |   | ++                   | + alcool amilico sec.                                     | 0,5 <sup>o</sup> /100      | —                    | 50  |
| + alcool isopropilico                                     | 1 <sup>o</sup> /100        |   | —                    | + alcool dimetiletalico                                   | 0,5 <sup>o</sup> /100      | —                    | 40  |
| + alcool butilico   | 1 <sup>o</sup> /100        |   | ++                   | + alcool esilico  | 0,25 <sup>o</sup> /100     | ++                   | 410 |
| + alcool isobutilico                                      | 1 <sup>o</sup> /100        |   | +                    | + alcool dietiletalico                                    | 0,25 <sup>o</sup> /100     | —                    | 85  |
| + alcool butilico sec.                                    | 1 <sup>o</sup> /100        |   | —                    | + cicloesanol   | 0,25 <sup>o</sup> /100     | —                    | 60  |

carbonio (PROVASOLI 1937); insistiamo sul fatto che tali acidi devono essere adoperati a concentrazioni molto deboli (vedi sulla tabella le concentrazioni da noi adoperate).

Gli acidi eptilico e octilico sono utilizzabili e favorevoli; gli acidi isobutirrico, isocaproico, decilico, laurico e miristico sono poco favorevoli ma sempre nettamente utilizzabili. L'acido isovalerianico è da noi considerato come inutilizzabile (90 fl. per mm.<sup>3</sup> contro 60 del controllo).

Noi confermiamo LWOFF e DUSI sulla utilizzazione dell'acido lattico e la non utilizzazione dell'acido tartarico, del glucosio e del levulosio. Non abbiamo potuto ottenere alcun effetto positivo con l'acido piruvico: in ciò siamo d'accordo con PRINGSHEIM e discordiamo da LWOFF e DUSI che trovarono tale acido utilizzabile. Gli acidi malico, e succinico che per PRINGSHEIM sono favorevoli non ci hanno dato alcun effetto positivo. Come lo notò PRINGSHEIM (1937), e noi confermiamo, l'alcool etilico è un buon alimento carbonato per *Astasia Chattoni*. Sperimentando con una serie di alcool abbiamo potuto constatare che gli alcool propilico, butilico, ed esilico sono altamente assimilati; l'alcool isobutilico è molto meno favorevole e gli alcool metilico, isopropilico, butilico secondario, butilico terziario, amilico, isoamilico, amilico secondario, dimetiletalico, dietiletalico e cicloesanololo sono senza alcun effetto sulla crescita di *Astasia Chattoni*, almeno coi campioni di alcool da noi impiegati e alle concentrazioni da noi sperimentate.

#### *Astasia quartana* Moroff em. Pringsheim

*Caratteri morfologici.* — PRINGSHEIM (1936) ha ride-scritta sotto il nome di *Astasia quartana* la specie da lui in precedenza descritta come *Astasia ocellata*. Tale specie presenta caratteri morfologici intermedi fra *Astasia ocellata* KHAWKINE e *Euglena quartana* MOROFF. Secondo PRINGSHEIM *Astasia quartana* presenterebbe i seguenti caratteri morfologici: corpo claviforme con la parte anteriore più larga, di forma ellissoidale od ovale fino a cilindrica; la parte posteriore per lo più alquanto corta, assottigliata gradatamente, o con due successivi restringimenti, può essere molto sottile ma mai appuntita. Caratteristica di tale specie è il labbro superiore protratto che con la sua posizione fa sì che la parte boccale appare spostata ventralmente; il flagello in conseguenza di ciò esce lateralmente. Cellule metaboliche che diventano sferiche con la fissazione. Palmelle e cisti rotonde. Le cellule sono lunghe 38-50  $\mu$  e larghe 14-16  $\mu$ ; la membrana cellulare presenta una striatura molto fine, obliqua di circa 45°; flagello lungo una volta e mezza il corpo; stigma rotondo, non molto colorato, vicino al vacuolo principale; nucleo posteriore al centro, situato nella parte del corpo che comincia a restringersi; granuli di paramido non molto piccoli, oviformi o irregolari o allungati; nuota ruotando lentamente.

*Storia.* — *Astasia quartana* fu isolata per la prima volta in coltura batteriologicamente pura da PRINGSHEIM (1921); più tardi da MAINX (1928); tali Autori la studiarono sotto il nome di *Astasia ocellata*. PRINGSHEIM (1921) studiò soprattutto *Astasia quartana* in coltura impura concludendo dalle sue ricerche che l'acido acetico avrebbe una influenza sulla moltiplicazione di tale specie in quanto che abbasserebbe il pH del mezzo nutritizio; tale effetto a suo parere poteva essere ottenuto anche coll'aggiunta dell'acido cloridrico o solforico al mezzo di coltura. Concluse anche, dalle sue esperienze in coltura pura, che gli acidi grassi non sono utilizzati. MAINX (1928) lavorando in coltura pura arriva pure alla medesima conclusione, e cioè che gli acidi grassi non sarebbero utilizzati da *Astasia quartana*, e ammette che tale specie possa coprire i suoi bisogni carbonati a spese degli aminoacidi contenuti nei peptoni.

Le migliori culture sono state da lui ottenute coll'ereptone e con un altro peptone molto degradato. LWOFF e DUSI sono i primi a mettere in evidenza l'effetto degli acidi grassi per le Euglene (*Euglena gracilis* 1928-1932 - *Astasia Chattoni* 1934). Noi abbiamo fatto rilevare in una nota di LWOFF (1936) che *Astasia quartana* come *Astasia Chattoni* è oxirofa e che l'acido acetico provoca delle colture molto più abbondanti che nel controllo. PRINGSHEIM riprendendo lo studio di *Astasia quartana* in coltura pura (1937) confermò l'utilizzazione dell'acido acetico ed espose i risultati da lui ottenuti con differenti acidi grassi per tale ceppo. (Vedi tabella 35).

#### *Ricerche personali.*

Il ceppo da noi isolato proviene da una coltura bruta ottenuta partendo da una terra coltivata a riso delle vicinanze di Milano.

Ottenemmo una coltura batteriologicamente pura e monofiletica con ripetuti lavaggi di un solo individuo (novembre 1935). Morfologicamente il nostro ceppo corrisponde perfettamente alle definizioni date da PRINGSHEIM per la specie *quartana*. Il mezzo che ha servito all'isolamento è quello che è stato usato successivamente per le esperienze, ha la seguente composizione:

|   |     |        |
|---|-----|--------|
| peptone pancreatico di carne 5 C (Vaillant) . . . . . | gr. | 4,—    |
| solfo di magnesio . . . . .                           | »   | 0,2    |
| fosfato acido di potassio . . . . .                   | »   | 0,2    |
| acqua bidistillata . . . . .                          | »   | 1000,— |

Il pH naturale di tale mezzo si aggira fra pH = 5,2 e pH = 5,4. Come si noterà, noi abbiamo escluso dalla formula del mezzo di base normale il cloruro potassico, poichè *Astasia quartana* sembra essere

sensibile ai cloruri. La zona di pH favorevole per *Astasia quartana* è compresa fra pH = 4,2 e pH = 6,8 (i limiti estremi esatti non furono da noi determinati); le nostre esperienze furono condotte a pH varianti fra 5,3 e 5,5. Nel mezzo di base da noi adoperato le colture di *Astasia quartana* sono povere, però trapiantabili indefinitamente (24 fl. per mm<sup>3</sup>). Nel mezzo di base a cui fu aggiunto dell'acetato di sodio al 2‰ noi ottenemmo delle colture abbondanti (332 flagellati per mm.<sup>3</sup>). Col mezzo con cui abbiamo sperimentato, in assenza di aereazione artificiale, il coefficiente di *oxitrofia* di *Astasia quartana* è di 13.

Astasia quartana (ceppo PROVASOLI)

TABELLA 35.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4‰) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 | Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4‰) | concentrazioni<br>dell'autore | E. G. Pringsheim<br>1937 | L. Provasoli<br>1938 |
|--|-------------------------------|--------------------------|----------------------|--|-------------------------------|--------------------------|----------------------|
| senza acidi (controllo)                  |                               | —                        | — 24                 | + acido epilico                          | 0,1‰                          |                          | + 100                |
| + acido acetico                          | 2‰                            | +                        | ++ 332               | + acido malico                           | 2‰                            | —                        |                      |
| + acido propionico                       | 1‰                            | +                        | ++ 505               | + acido lattico                          | 2‰                            | —                        | + 170                |
| + acido butirrico                        | 1‰                            | +                        | ++ 460               | + acido piruvico                         | 2‰                            | —                        | + 70                 |
| + acido isobutirrico                     | 1‰                            | —                        | + 72                 | + acido succinico                        | 2‰                            | +                        |                      |
| + acido valerianico                      | 0,5‰                          | —                        | ++ 200               | + aldeide glicerica                      | 2‰                            | —                        |                      |
| + acido isovalerianico                   | 0,5‰                          | —                        | + 80                 | + diossiacetone                          | 2‰                            | —                        |                      |
| + acido caproico                         | 0,2‰                          | —                        | + 122                | + alcool etilico                         | 2‰                            | —                        | — 24                 |
| + acido isocaproico                      | 0,2‰                          | —                        | + 120                |  |                               |                          |                      |

Confermiamo i risultati ottenuti da PRINGSHEIM cogli acidi propionico e butirrico; tali acidi sono favorevoli e utilizzati anche meglio dell'acido acetico. Gli acidi: isobutirrico, valerianico e caproico non hanno dato alcun risultato a PRINGSHEIM, noi al contrario abbiamo ottenuto un leggero effetto coll'acido isobutirrico (72 flagellati per mm.<sup>3</sup> contro 24 del controllo); gli acidi valerianico e caproico ci hanno dato delle buone culture e sono da noi considerati come nettamente favorevoli. Abbiamo constatato d'altra parte che l'acido valerianico è già tossico a concentrazione del 1‰; fu da noi impiegato con successo ed una concentrazione del 0,5‰. L'acido caproico è tossico ad una concentrazione di 0,5‰: le nostre esperienze furono eseguite ad una concentrazione del 0,2‰. Pensiamo che i risultati negativi ottenuti da PRINGSHEIM con

tali acidi siano dovuti al fatto che egli li sperimentò ad una concentrazione tossica. Noi abbiamo potuto ottenere buone colture anche cogli acidi isocaproico ed eptilico che adoperammo rispettivamente alle concentrazioni del 0,2‰ e 0,1‰. Facemmo già notare (PROVASOLI 1938) che l'acido eptilico è nettamente tossico ad una concentrazione di 0,25‰. I nostri risultati riguardo agli acidi lattico e piruvico sono pure in disaccordo con quelli ottenuti da PRINGSHEIM che li definì come inutilizzabili; noi otteniamo un leggero effetto con l'acido piruvico e delle buone colture con l'acido lattico. Possiamo al contrario confermare l'inutilizzabilità dell'alcool etilico (PRINGSHEIM 1937). Crediamo opportuno ricordare ancora una volta che le nostre esperienze sono state eseguite con due serie di sette trapianti successivi in ciascuno dei mezzi in istudio, e che lo studio di tale specie fu eseguito in due anni di sperimentazioni.

## COMPARAZIONE DEI VARI TIPI DI NUTRIZIONE CARBONATA NEI PROTOZOI

*Fototrofia e aplotrofia.* — Noi abbiamo già diviso, secondo il concetto direttivo impiegato da CHATTON e da LWOFF, i *protisti eucarioti* in 3 categorie: *clorofiti*, *leucofiti* e *protozoi*. Tale divisione è basata su osservazioni fisiologiche e morfologiche e non ha la pretesa di creare delle serie naturali di organismi, ma piuttosto quella di poter chiamare comprensivamente forme aventi alcuni caratteri morfologici comuni che implicano una fisiologia speciale e comune.

Nell'introduzione ci limitammo a descrivere l'insieme dei caratteri morfologici tipici di ciascuna di queste tre divisioni. Dicemmo che *clorofiti* sono tutti quei protisti eucarioti che possiedono uno o più plasti, provvisti di pigmento assimilatore; che i *leucofiti* sono tutti i protisti eucarioti aventi uno o più plasti, riserve glucidiche figurate ma sprovvisti di pigmento assimilatore; che i *protozoi* sono tutti i protisti eucarioti sprovvisti di plasto, di pigmento assimilatore e incapaci di sintetizzare le riserve glucidiche figurate. A questi caratteri di ordine morfologico corrispondono caratteri fisiologici trofici, tipici per ciascuno dei gruppi.

Noi non disenteremo qui le conclusioni e le divisioni create da LWOFF nella nutrizione azotata dei protisti, essendo lo scopo del presente lavoro, ristretto al modo speciale di nutrizione carbonata dei leucofiti: *l'oxitrofia*.

Ciò anche perchè, da recentissime ricerche, si è potuto riscontrare che microorganismi che sembrava avessero un assoluto bisogno di sostanze complesse (peptoni) in realtà sono capaci di fare la sintesi dei propri costituenti citoplasmatici partendo da sostanze semplici (sali di ammonio, aminoacidi), qualora siano presenti nei mezzi nutritivi dei fattori di crescita che sono normalmente contenuti nei peptoni. Bisognerà quindi attendere che tale parte della fisiologia dei microorganismi sia maggiormente sviluppata per poter elaborare di nuovo con altri concetti una classificazione delle richieste azotate dei microorganismi. La nutrizione carbonata dei *clorofiti* dipende ed è strettamente legata ai caratteri morfologici strutturali di tale categoria.

La presenza di uno o più plasti a pigmento assimilatore porta automaticamente con sé il potere di sintetizzare con l'aiuto della fotosintesi le sostanze idrocarbonate di riserva (amido e paramilo) a spese del CO<sub>2</sub> atmosferico. La massa di lavori esistenti in proposito sull'assimilazione

clorofilliana delle piante superiori, ci risparmia di dover confermare tale affermazione. D'altra parte la sperimentazione compiuta sulle specie di clorofiti sino ad ora ottenute in coltura pura, conferma pienamente le teorie stabilite con organismi superiori. Tale modo di nutrizione carbonata dei clorofiti è stato definito da LWOFF col nome di *fototrofia*.

Alcuni dei clorofiti però sono obbligatoriamente fototrofi, cioè, l'assimilazione del CO<sub>2</sub> atmosferico per mezzo del processo fotosintetico è indispensabile.

Infatti delle *Euglene* studiate fino ad ora, solamente *Euglena gracilis* e *Euglena gracilis* var. *urophora*, possono fare la sintesi delle sostanze idrocarbonate anche all'oscurità, in assenza quindi del processo di fotosintesi clorofilliana. In tali condizioni questi due clorofiti si comportano nei loro bisogni carbonati esattamente come i leucofiti, cioè hanno bisogno di un alimento carbonato organico indipendente da cui partono per la sintesi delle sostanze idrocarbonate di riserva.

I *protozoi sensu stricto*, secondo la definizione di LWOFF, sono i protisti eucarioti che non possiedono plasto, nè pigmento assimilatore e non fanno la sintesi di sostanze amilacee. Tali microorganismi in dipendenza dei caratteri sopra enunciati, hanno uno speciale modo di nutrizione: non avendo essi nè plasto con pigmento assimilatore nè un leucoplasto, e non facendo la sintesi di sostanze amilacee, gli acidi grassi non hanno su di loro alcun effetto.

Questa conclusione è basata su parecchi fatti sperimentali che noi teniamo a ricordare. Già dal 1923 LWOFF aveva potuto coltivare il ciliato *Glaucoma pyriformis* in un mezzo peptonato sprovvisto di alimenti carbonati organici indipendenti. Questo fatto è stato confermato pienamente da ulteriori ricerche eseguite dalla scuola americana su altri Ciliati di specie vicine a quella coltivata a LWOFF: HETHERINGTON coltivò *Colpidium campylum* e *Loxocephalus granulatus*, ELLIOT, *Colpidium campylum* e *Colpidium striatum*, JOHNSON, *Glaucoma ficaria*; tutti questi Autori hanno ottenuto buone culture cogli organismi citati, in un mezzo peptonato semplice. Anche l'ameba *Acanthamoeba Castellanii* fu coltivata da CAILLEAU in un mezzo peptonato; ad analoghe conclusioni arrivò REICH con *Mayorella palestinensis*. Numerosi flagellati parassiti appartenenti ai generi *Strigomonas* e *Leptomonas*, furono ottenuti in coltura pura da M. LWOFF e possono svilupparsi perfettamente in un mezzo peptonato. Alcuni di essi richiedono, in più del peptone, l'aggiunta di fattori di crescita. Altri flagellati parassiti quali *Eutrichomastix colubrorum*, *Trichomonas foetus*, possono svilupparsi in mezzi al brodo peptonato a cui sono aggiunte altre sostanze organiche necessarie alla crescita di tali microorganismi, quali: sangue, fegato e siero (CHATTON, WITTE, BOS, CAILLEAU). Tutti questi microorganismi possono dunque svilupparsi

in un mezzo azotato organico e non sentono la necessità dell'aggiunta di un alimento organico carbonato specifico (acidi grassi).

Dato che la percentuale di peptone normalmente adoperata per tali colture è sufficientemente elevata (20‰), LWOFF si domandò se diminuendo la concentrazione dell'alimento azotato, non si potesse mettere in evidenza il bisogno e l'azione favorevole degli acidi grassi per tali organismi. Tale Autore eseguì delle colture con *Glaucoma pyriformis* e *Strigomonas oncopelti* in mezzi peptonati al 2‰ e al 4‰ con e senza aggiunta di acido acetico (alimento carbonato organico che è favorevole a tutti i leucofiti): non ottenne alcuna differenza nello sviluppo delle colture.

LWOFF eseguì pure in un mezzo peptonato al 20‰ delle prove di non inibizione con varie concentrazioni di acido acetico (da 0,2 a 2‰) e poté notare che l'acido acetico aggiunto in un mezzo alla concentrazione *optimum* di sostanze azotate, non ha alcun effetto benefico nè inibitore.

Ci sembra giusto quindi concludere, con LWOFF, che, allo stato attuale della sperimentazione, la moltiplicazione e la crescita dei protozoi in senso stretto non è influenzata dalla presenza o dall'assenza di acidi grassi nel mezzo nutritizio. LWOFF, definisce i protozoi in senso stretto come *aplotrofi*, cioè microorganismi per i quali un alimento azotato organico complesso (peptone) può servire pure ai bisogni della nutrizione carbonata.

In opposizione al gruppo degli *aplotrofi* esiste quello degli *oxitrofi* nel quale sono compresi tutti i microorganismi che in più di un alimento azotato, richiedono un alimento carbonato organico indipendente (acidi grassi). Tale modo di nutrizione molto particolare è proprio dei *leucofiti* e noi vedremo che è strettamente legato alla presenza del leucoplasto e della formazione di riserve glucidiche figurate.

#### *L'oxitrofia.*

*Storia.* — Nel 1921 PRINGSHEIM mostrò per primo che l'acido acetico e butirrico avevano un grande effetto sulla crescita e lo sviluppo di *Polytoma uvella*. A lui spetta inoltre il merito di aver compreso che tali acidi grassi servivano come punto di partenza per la sintesi delle riserve idrocarbonate figurate che tale specie ha sempre nel proprio citoplasma.

A tale epoca però era impossibile stabilire una concezione più larga e generalizzare ad altri microorganismi l'osservazione che PRINGSHEIM aveva fatta sulla utilizzazione degli acidi grassi da parte di *Polytoma uvella*. Infatti PRINGSHEIM (1921) studiando *Chilomonas* in coltura impura aveva notato che tale specie era influenzata dalla presenza di glu-

acidi nel mezzo nutritizio. DOFLEIN (1916) aveva prima di lui creato un gruppo che chiamò « *Zuckerflagellaten* », in cui comprendeva un gran numero di flagellati che, in cultura impura, utilizzavano largamente i glucidi. Facciamo notare che a tale epoca non essendosi ancora ottenute delle colture pure era difficile porsi la domanda se realmente gli zuccheri erano assimilati direttamente dai flagellati o se venivano previamente attaccati dai batteri presenti nelle colture impure. Inoltre PRINGSHEIM (1921) aveva ottenuto in cultura impura anche *Astasia quartana* (*ocellata*) ed aveva osservato che l'acido acetico aveva una influenza sull'andamento delle colture, ma siccome tale effetto benefico poteva essere ottenuto pure cogli acidi cloridrico e solforico, concludeva che l'effetto favorevole dell'acido acetico per *Astasia quartana* era dovuto, più che altro, ad un abbassamento del pH nel mezzo di coltura. Egli ottenne in coltura pura tale specie e dalle sue esperienze dedusse che gli acidi grassi non avevano alcuna azione sulla moltiplicazione di *Astasia quartana*. Si vede quindi come PRINGSHEIM, che ebbe il grande merito di scoprire per primo l'utilizzazione degli acidi grassi per il flagellato *Polytoma uvella*, e di capire che tali acidi erano punto di partenza per la sintesi delle sostanze amilacee di riserva, non poteva a tale epoca, dati i risultati non concordanti ottenuti con *Chilomonas* e *Astasia quartana*, vedere chiaramente che tale modo speciale di nutrizione era comune a parecchi altri microorganismi. MAINX, nel 1928, riprese lo studio della nutrizione di *Astasia quartana* ed arrivò a conclusioni analoghe a quelle di PRINGSHEIM. Tale Autore studiò pure la nutrizione di parecchie *Euglene* ma non potè mettere in evidenza l'effetto che gli acidi grassi hanno sulla moltiplicazione di *Euglena gracilis* all'oscurità.

LWOFF (1929-32) eseguì una serie di brillanti ricerche su leucofiti e clorofiti sperimentalmente privati della funzione clorofilliana; egli confermò i risultati di PRINGSHEIM sull'influenza che gli acidi grassi acetico e butirrico hanno sulla moltiplicazione di *Polytoma uvella* (il ceppo studiato da LWOFF è stato chiamato più tardi *Polytoma obtusum*).

A. ed M. LWOFF (1929-1930) conclusero che l'acido acetico era nettamente assimilato da *Haematococcus pluvialis* e da *Chlamydomonas agloëformis* all'oscurità.

LWOFF e DUSI (1929-31) hanno avuto il merito di mostrare per primi che *Euglena gracilis* coltivata all'oscurità in assenza della funzione clorofilliana era nettamente influenzata dalla presenza di acidi grassi e che un clorofita privato della clorofilla si comportava, nella nutrizione carbonata, esattamente come un leucofita (*Polytoma uvella*).

LWOFF (1932), avendo a disposizione tale complesso di risultati, potè prospettare in un quadro complessivo il problema dei poteri di sintesi dei microorganismi e delimitare alcuni tipi fisiologici che esistono

nei microorganismi. In questa sua monografia egli delimitò, fra i vari modi di nutrizione dei microorganismi, le tipiche esigenze degli oxiotrofi.

Successivamente molti altri leucofiti e clorofiti, coltivati in assenza di funzione clorofilliana, dimostrarono di possedere tutti i caratteri fisiologici che LWOFF diede come tipici per gli oxiotrofi.

Per brevità di spazio noi daremo una lista delle specie studiate fino ad oggi seguendo il concetto di priorità nell'isolamento in coltura pura; tutti questi microorganismi hanno dimostrato di assimilare l'acido acetico od altri acidi grassi per i bisogni della loro nutrizione carbonata.

I clorofiti compresi in questa lista sono stati studiati dai vari Autori all'oscurità cioè in assenza di funzione clorofilliana.

- Polytoma uvella* (E. G. Pringsheim 1921-26-37; L. Provasoli 1937).  
*Polytoma obtusum* (A. Lwoff 1929-32; A. Lwoff e L. Provasoli 1937).  
*Chlamydomonas agloëformis* (A. e M. Lwoff 1929).  
*Haematococcus pluviialis* (A. e M. Lwoff 1929).  
*Euglena gracilis* (A. Lwoff e H. Dusi 1929-31; A. Lwoff 1932; H. Dusi 1933; E. G. Pringsheim 1937; L. Provasoli 1938).  
*Chlamydomonas pseudagloë, monoica, dorsoventralis, subglobosa, pulchra* (I. Lucksh 1932).  
*Chlorogonium euchlorum* (J. B. Loefer 1934-35; E. G. Pringsheim 1934-1935; A. Lwoff e H. Dusi 1935; E. G. Pringsheim 1937).  
*Chlorogonium elongatum* (J. B. Loefer 1934-35).  
*Astasia Chattoni* (A. Lwoff e H. Dusi 1934-36; E. G. Pringsheim 1937; L. Provasoli 1938).  
*Polytomella coeca* (E. G. Pringsheim 1935; A. Lwoff 1935; E. G. Pringsheim 1937; L. Provasoli 1938).  
*Chilomonas paramoecium* (J. B. Loefer 1934; A. Lwoff e H. Dusi 1934; E. G. Pringsheim 1937; L. Provasoli 1938).  
*Polytoma caudatum* (A. Lwoff e Provasoli 1935).  
*Astasia quartana (ocellata)* (E. G. Pringsheim 1922; F. Mainx 1928; L. Provasoli 1936; E. G. Pringsheim 1937; L. Provasoli 1938).  
*Hyalogonium Klebsii* (E. G. Pringsheim 1937).  
*Chilomonas oblonga* (E. G. Pringsheim 1937).  
*Polytoma ocellatum* (E. G. Pringsheim 1937; L. Provasoli 1937).  
*Euglena gracilis var. urophora* (L. Provasoli 1938).

Tutti questi leucofiti e clorofiti privati sperimentalmente della fotosintesi clorofilliana sono degli oxiotrofi cioè, l'aggiunta di acidi grassi apporta un forte miglioramento allo sviluppo delle loro colture.

*Definizione dell'oxitrofia.* — LWOFF (1932) definì organismi *oxitrofi* quelli per i quali un alimento carbonato organico indipendente è indispensabile, qualunque sia l'alimento azotato. In seguito coll'estendersi delle ricerche ad altre specie appartenenti ai leucofiti, LWOFF constatò che non sempre gli acidi organici sono indispensabili. Furono le constatazioni fatte a tale proposito con *Astasia Chattoni*, *Chilomonas paramoecium*, *Polytomella coeca*, che convinsero LWOFF sulla opportunità di costituire il gruppo parallelo dei *para-oxitrofi* (1934) in cui sono compresi quegli organismi, fisiologicamente molto vicini agli *oxitrofi*, per i quali gli acidi grassi non sono indispensabili ma molto favorevoli.

In seguito tale Autore stabilì un modo di valutare praticamente l'effetto prodotto dagli acidi grassi ed istituì un *coefficiente di oxitrofia*.

Tale coefficiente è ottenuto facendo un rapporto fra il numero massimo di organismi che si sviluppano in un mezzo sprovvisto di acidi grassi ed il numero massimo ottenuto in un mezzo uguale a cui fu aggiunto il 2<sup>o</sup>/<sub>100</sub> di acetato sodico.

Con tale metodo si poté determinare il coefficiente di oxitrofia delle varie specie fino ad oggi ottenute in coltura pura.

LWOFF poté notare che non esistevano demarcazioni nette fra gli organismi definiti come *para-oxitrofi* e quelli definiti strettamente *oxitrofi* poichè il coefficiente di oxitrofia può variare da 6 (*Polytomella coeca*) a 1000 (*Polytoma uvella*). Tale Autore credette opportuno dunque, istituire una nuova definizione più comprensiva dell'oxitrofia che si deve considerare attualmente come la *condizione fisiologica degli organismi ai quali un alimento carbonato organico indipendente in più di un alimento azotato organico, è indispensabile, o sullo sviluppo dei quali, gli alimenti carbonati organici, hanno un'azione favorevole specifica* (1935).

*Relazione fra i caratteri morfologici e i caratteri fisiologici.* — Nell'introduzione, noi esponemmo i caratteri morfologici dei clorofiti, dei leucofiti, e dei protozoi in senso stretto. Aggiungemmo che ci saremmo riservati di descrivere i caratteri fisiologici di questi tre gruppi e di mostrare che esiste una connessione fra questi e i caratteri morfologici.

*Leucofiti*, sono stati definiti quegli organismi che sono provvisti di uno o più plasti, di riserve figurate amilacee e sprovvisti di pigmento assimilatore.

Nella parte morfologica, abbiamo fatto notare che, già in molti dei leucofiti ottenuti in coltura pura, con ricerche di fine istologia, si è messo in evidenza la presenza in tali organismi di un leucoplasto.

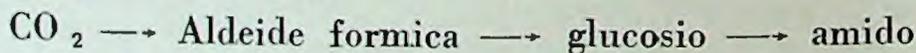
Riteniamo che, con ricerche speciali, sarà possibile mettere in evidenza anche negli altri leucofiti tale organo assimilatore e ci pare accettabile l'affermazione di LWOFF che, tutti i leucofiti possiedono un plasto provvisto di pigmento assimilatore. Dicemmo, a seguito delle brillanti ricerche della scuola di GUILLERMOND e di quelle di VOLKONSKY, che il plasto è l'organo deputato all'amilogenesi: tale constatazione, a *contrariis*, porta un appoggio all'affermazione di LWOFF, che tutti i leucofiti possiedono un plasto, poichè nella definizione di leucofiti si dice chiaramente che questi microrganismi possiedono delle riserve amilacee figurate e quindi devono possedere l'organo necessario per sintetizzare tali sostanze.

Il carattere fisiologico distintivo di questo gruppo di protozoi, è l'*oxitrofia*, cioè il bisogno o l'azione favorevole che esercita un alimento carbonato organico indipendente (acidi grassi). Già PRINGSHEIM (1921) emise l'ipotesi che l'acido acetico servisse come punto di partenza per la sintesi delle riserve idrocarbonate.

LWOFF (1932) poté constatare che le esigenze carbonato di un clorofita privato della clorofilla (*Euglena gracilis*), e di un leucofita (*Polytoma obtusum*), sono identiche. Ambedue queste specie, nelle condizioni di sperimentazione adoperate da LWOFF, possiedono caratteri identici: la presenza di un leucoplasto e di riserve glucidiche figurate. Ambedue hanno un modo di nutrizione carbonata tipico: l'*oxitrofia*.

LWOFF concluse che gli acidi grassi ed in special modo l'acido acetico, che è il più favorevole fra gli acidi grassi adoperati, si devono considerare come l'alimento elettivo del plasto; questa affermazione è convalidata, per opposizione, dal fatto che i protozoi in senso stretto, che sono sprovvisti di plasto e di riserve amilacee, non hanno bisogno di un alimento carbonato organico indipendente.

Dal 1932 ad oggi, le ricerche che si sono susseguite sui vari protisti ottenuti in coltura pura, non hanno fatto che confermare le affermazioni di LWOFF: fino ad oggi, tutti i leucofiti e i clorofiti, sperimentalmente privati dell'assimilazione clorofilliana, sono *oxitrofi*. Il fatto che esista una identità di modo di nutrizione fra forme stabilmente decolorate e forme verdi sperimentalmente private della assimilazione clorofilliana, ha fatto avanzare a LWOFF la seguente ipotesi di lavoro. Lo schema classico della sintesi dell'amido durante la fotosintesi clorofilliana segue le seguenti tappe:



Seguendo tale schema è lecito pensare che qualcuna di queste sostanze prodotte come tappe intermedie fra l'anidride carbonica e l'amido, possano supplire come alimento del plasto qualora a questo si inibisca la funzione fotosintetica.

Ora abbiamo visto nella parte speciale che gli zuccheri e il glucosio sono senza alcun effetto sulla moltiplicazione dei leucofiti e dei clorofiti sperimentalmente privati della funzione clorofilliana e che al contrario l'acido acetico è la sostanza universalmente assimilata dai leucofiti e permette ai clorofiti, in assenza della fotosintesi, di sintetizzare l'amido.

LWOFF, avanza dunque l'interessante ipotesi, che, poichè l'acido acetico può rimpiazzare nel funzionamento del plasto l'assenza dei prodotti dell'assimilazione fotosintetica, sarebbe una delle prime tappe intermedie della sintesi dell'amido nella funzione clorofilliana e avanza a titolo di ipotesi di lavoro che lo schema dell'amilogenesi degli organismi verdi sia  $\text{CO}_2 \longrightarrow \dots \text{acido acetico} \longrightarrow \dots \text{amido}$ .

## DISCUSSIONE SULLA FISIOLOGIA DELLA NUTRIZIONE DELLE SPECIE STUDIATE

Nel vari paragrafi del capitolo II° esponemmo molto sinteticamente i risultati ottenuti dagli Autori che ci precedettero ed i nostri. A questo punto ci sentiamo autorizzati a trarre conclusioni sicure perchè i risultati ottenuti sono il frutto di lunghe e ripetute esperienze condotte per tre anni consecutivi. Complessivamente si trattò di circa 8000 tubi di coltura; ogni risultato è stato ricontrollato con numerosi passaggi in serie; facemmo almeno due serie, ciascuna delle quali comprendente un numero di trapianti successivi in ciascuna delle sostanze in istudio e procedemmo alle numerazioni necessarie alla valutazione dell'effetto delle varie sostanze in esperimento, solo dopo che attraverso i trapianti in serie abbiamo ottenuto un risultato costante. Eseguiamo pure numerose prove batteriologiche per accertarci che i nostri ceppi e le colture fossero sempre batteriologicamente pure.

1) *Stabilità e specificità dei caratteri fisiologici.* — Durante la prima parte del lavoro, in cui ci eravamo proposti di ottenere in coltura pura il maggior numero possibile delle specie comprese nel genere *Polytoma*, isolammo 7 ceppi di *Polytoma uvella*, 3 ceppi di *Polytoma caudatum*, var. *astigmata* ed 1 ceppo di *Polytoma obtusum*. Rispettivamente, la fisiologia di *Polytoma uvella* fu studiata con 7 ceppi nostri e il ceppo (« stämme 1921 ») di PRINGSHEIM; *Polytoma caudatum* su 3 ceppi nostri; *Polytoma obtusum* sul ceppo LWOFF (1925 - *Polytoma uvella*) e 1 ceppo nostro; *Polytoma ocellatum* sui ceppi « stämme 1 » e « stämme 2 » di PRINGSHEIM.

Come abbiamo riferito nei capitoli riguardanti le singole specie, i risultati ottenuti coi vari ceppi di ogni specie, sono identici: esistono solamente, specialmente per i due ceppi di *Polytoma ocellatum* differenze nello sviluppo numerico degli individui in coltura; si tratta però di differenze fisiologiche minime consistenti nel rispondere all'assimilazione di determinati acidi grassi con una crescita numericamente più o meno abbondante; ma il fenomeno è sostanzialmente uguale e queste differenze non offrono base ad una distinzione di varietà o specie fisiologiche. Gli 8 ceppi di *Polytoma uvella* studiati hanno pure presentato fra di loro differenze simili in presenza di acido valerianico e in minor misura, in presenza di acido caproico.

Se però confrontiamo i risultati ottenuti in acido valerianico per i

ceppi n. 4 e n. 5, coi risultati ottenuti nel mezzo base sprovvisto di acidi grassi, vediamo che ambedue i ceppi assimilano l'acido valerianico, dato che il controllo delle due specie dà una coltura poverissima. È logico quindi di non scindere ceppi che presentano caratteri fisiologici uguali di assimilazione di determinati acidi, solamente perchè l'effetto sullo sviluppo è stato minore in alcuni e superiore in altri. La concordanza dei risultati che noi abbiamo ottenuto coi diversi ceppi, è veramente un fatto importante, specialmente se si pensa che i terreni da cui sono stati ottenuti i vari ceppi da noi isolati provenivano da località molto differenti sia per posizione geografica, che per condizioni climatiche e per altitudine sul livello del mare. Infatti noi ottenemmo un ceppo dall'Italia del Sud (Portici), uno dall'Italia del Nord (Casale Monferrato), due ceppi svizzeri (Kandersteg), un ceppo dalla Cecoslovacchia (« stämme 1921 » di PRINGSHEIM - Praga), un ceppo dalla Russia (Karkow) e un ceppo dall'America del Sud (Santiago del Chili). Riguardo all'altitudine sul livello del mare, noi abbiamo un ceppo preso ad altitudine 0 (Portici); la maggioranza proviene da altezze comprese fra i 200 e i 500 metri sul livello del mare, infine i due ceppi di Kandersteg provengono da una località a 1140 metri sul livello del mare. Dei due ceppi di *Polytoma obtusum* uno proviene da sterco di cavallo delle scuderie dell'Istituto Pasteur di Parigi (ceppo LWOFF), l'altro da una terra di giardino dell'Università di Delft (Olanda). Il fatto che tali ceppi provengano da località diverse, da ambienti naturali fisicamente e chimicamente diversi, e che ciò nonostante presentino uguali caratteri morfologici e fisiologici, ci permette di concludere che, per quel che riguarda la nutrizione, *esiste in realtà, nelle specie, una stabilità di caratteri fisiologici, come esiste la stabilità dei caratteri morfologici.*

Al contrario, tutte le volte che si riscontrò fra ceppi di una provenienza diversa, una differenza morfologica minima, riscontrammo anche con le colture, una corrispondente differenza fisiologica, cosicchè non è da escludersi che, a somiglianza di quanto è già avvenuto in batteriologia, la sistematica dei Protozoi, in alcuni casi, possa in avvenire giovare dell'esatta conoscenza fisiologica, per il sicuro riconoscimento della specie.

È questo il caso di *Polytoma obtusum* che sottoposto ad uno studio morfologico comparativo, (L. GRANDORI) con la specie *Polytoma uvella*, ha permesso di stabilire che le differenze fra il valore medio dell'indice di sfericità dei ceppi di *Polytoma uvella* e quello del ceppo *P. obtusum*, è superiore sensibilmente a tre volte l'errore medio della loro differenza. L'ordine di grandezza di tali differenze avrebbe permesso solamente la distinzione di due razze diverse, e da solo non sarebbe stato sufficiente come carattere distintivo fra due specie.

Si potè erigere a specie distinta il tipo *P. obtusum* solo perchè in aggiunta a questa differenza biométrica dell'indice di sfericità, esistevano in più caratteri fisiologici della specie *P. obtusum* nettamente differenti da quelli della specie *P. uvella*.

Dallo studio comparativo eseguito sui vari ceppi ottenuti in coltura pura, di ogni specie del genere *Polytoma*, abbiamo notato che il carattere zona di pH favorevole non è un carattere tipico di tutti i ceppi appartenenti ad una determinata specie. Ricordiamo che nella specie *P. uvella*, di cui noi potemmo isolare il più gran numero di ceppi, quattro ceppi possiedono una zona di pH favorevole compresa fra  $\text{pH} = 5,0$  e  $8,5$ ; due ceppi hanno una zona favorevole compresa fra  $\text{pH} = 5,5$  e  $\text{pH} = 8,5$ ; due ceppi hanno una zona favorevole compresa fra  $\text{pH} = 6$  e  $\text{pH} = 8,5$ . Esiste quindi una zona di pH favorevole comune a tutti i ceppi compresa fra  $\text{pH} = 6$  e  $\text{pH} = 8,5$ , mentre le differenze fra le punte massime della zona acida di pH favorevole si riducono ad una sola unità. Le differenze maggiori fra le zone di pH favorevoli, fino ad ora osservate nel genere *Polytoma*, sono quelle esistenti fra i due ceppi della specie *P. obtusum*. Infatti mentre il ceppo LWOFF ha dei limiti molto stretti di pH favorevole, compresi fra  $\text{pH} 7,2$  e  $8,5$ , il ceppo PROVASOLI può svilupparsi direttamente in zone di pH comprese fra  $\text{pH} = 5,5$  e  $\text{pH} = 8,4$ .

In questa specie, un ceppo può svilupparsi solamente nella zona basica, l'altro in più che nella zona basica, può crescere in una parte della zona acida e le differenze sono veramente notevoli. Da questi risultati ci sembra di poter concludere che *non esiste stabilità fisiologica nel carattere « zona di pH favorevole »*.

Dai risultati delle ricerche eseguite dagli altri Autori e dalle nostre, risulta che non esiste solamente una stabilità di caratteri fisiologici nella nutrizione carbonata e azotata, ma che *ogni specie ha un potere specifico e tipico di assimilare un determinato gruppo di acidi organici* (della serie grassa satura monocarbossilica come della serie grassa bicarbossilica), che può essere più o meno esteso a seconda della forza di potere ossidativo che ciascuna delle specie possiede.

2) *Indipendenza del potere di sintesi azotata e della nutrizione carbonata.* — Se da una parte è innegabilmente provato dalle ricerche di KOSTYTSCHEW (1926) e di WARBURG (1920) che l'assimilazione e la riduzione dei nitrati avviene nei coloroplasti, e che la sintesi delle proteine, almeno nella prima parte della organizzazione dell'azoto, dipende ed è legata al processo fotosintetico clorofilliano. d'altra parte è stato recentemente provato dagli studi di DUSI e di HUTNER

che anche organismi usufruenti della funzione clorofilliana possono avere esigenze azotate complesse. Le ricerche di DUSI e di HUTNER sono basate su un gruppo di *Euglene* coltivate alla luce in presenza della funzione clorofilliana. Delle specie studiate solamente tre: *Euglena gracilis*, *Euglena stellata*, *Euglena Klebsii*, possono assimilare i nitrati; le altre quattro specie: *Euglena anabaena*, *Euglena deses*, *Euglena pisciformis* ed *Euglena viridis*, non possono assimilare alla luce, nè i nitrati nè i sali d'ammonio e hanno bisogno di aminoacidi o di peptoni. Analoghe considerazioni si possono fare in rapporto al leucoplasto: le ricerche di VOLKONSKY sul leucoplasto di *Polytoma obtusum* hanno infatti dimostrato che lo spessore e le ramificazioni del leucoplasto di tale specie sono variabili col variare dei mezzi nutritizi in cui tale organismo è coltivato: se la fonte azotata è costituita da un sale d'ammonio il leucoplasto è molto più spesso e molto più ramificato, se la fonte azotata è costituita da aminoacidi o peptoni il leucoplasto è più esile e meno ramificato.

Da queste constatazioni biochimiche e morfologiche si deve dedurre che il leucoplasto e i cloroplasti sono la sede della sintesi degli aminoacidi e dei primi stadi della proteosintesi; ma anche nel caso del leucoplasto se esso interviene obbligatoriamente nel caso di organicazione di azoto inorganico, la presenza di esso in un organismo non porta con sè obbligatoriamente la possibilità da parte di tale organismo di assimilare l'azoto inorganico.

Infatti, come fu già osservato da LWOFF (1932) e da DUSI (1933), i leucofiti e i clorofiti sperimentalmente privati della funzione clorofilliana che in rapporto alla nutrizione carbonata sono degli oxiotrofi, possono avere un potere di sintesi nella nutrizione azotata più o meno esteso.

Per esempio fra i *Polytoma* che sono tutti oxiotrofi, come fu provato da LWOFF e DUSI (1938) si trovano delle specie come *Polytoma obtusum* e *Polytoma uvella* che possono assimilare i sali d'ammonio, specie come *Polytoma caudatum* che hanno bisogno in più dei sali d'ammonio dei fattori di crescita e una specie poi che in presenza di fattori di crescita può fare le proprie sintesi partendo da nitrati (*Polytoma ocellatum*). Inoltre molti dei leucofiti e dei clorofiti coltivati al buio richiedono nella loro nutrizione azotata sostanze complesse come i peptoni; ebbene tutte queste forme riguardo alla loro nutrizione carbonata sono tutti degli oxiotrofi. Al contrario vi sono specie che hanno uguale potere di sintesi come *Polytoma uvella* e *Polytoma obtusum*, poichè ambedue assimilano i sali d'ammonio, mentre riguardo alla nutrizione carbonata queste due specie hanno un diverso potere di ossidazione; infatti mentre *Polytoma uvella* può ossidare acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio (acido octilico), *Polytoma obtusum* attualmente è capace solo di ossidare

l'acido acetico e, soltanto dopo un previo adattamento, il butirrico. Questi risultati sono in perfetto accordo con quelli ottenuti da DUSI (1933) per la nutrizione delle Euglene alla luce. Si può quindi concludere da questi dati che la nutrizione azotata può soltanto in certi casi essere in stretto rapporto colla nutrizione carbonata (caso dei clorofiti coltivati alla luce e assimilanti i nitrati).

3) *Particolarità insite nell'assimilazione degli acidi grassi.* — Abbiamo fatto rilevare nella parte « tecnica della sperimentazione » che per primi abbiamo potuto constatare un effetto tossico degli acidi grassi sullo sviluppo degli organismi coltivati. Rilevammo infatti che l'acido caproico era considerato dalla maggioranza degli Autori non usufruibile perchè essi lo usavano in concentrazioni troppo forti. Istituimmo allora delle prove di non tossicità (diluizioni successive ed aumentanti dell'acido grasso in istudio), dirette a scoprire le concentrazioni più opportune a cui impiegare gli acidi grassi aventi una catena di atomi di carbonio più lunga di 6 atomi.

La concentrazione del 2‰ non è dannosa ai vari organismi da noi studiati per gli acidi acetico, butirrico. Gli acidi valerianico ed isovalerianico non sono tossici a tale concentrazione per i *Polytoma*, lo sono al contrario per le *Euglene* e *Astasia quartana*. La concentrazione del 2‰ è nettamente tossica per tutti gli organismi studiati quando si adopera l'acido caproico, che perde la sua tossicità, in generale, solo quando venga sperimentato ad una diluizione di circa dieci volte superiore. Tale effetto di tossicità cresce lentamente ma costantemente man mano che la catena degli atomi di carbonio degli acidi grassi aumenta di lunghezza, così che noi siamo stati costretti a sperimentare cogli acidi caproico, isocaproico, eptilico ed octilico a concentrazioni di 0,2‰; per l'acido nonilico a concentrazioni varianti fra 0,15 e 0,1‰; per gli acidi decilico, laurinicco e miristicco a concentrazioni di 0,07‰.

La sensibilità alla tossicità di questi acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio è diversa nelle varie specie da noi studiate e persino nei diversi ceppi appartenenti ad una stessa specie. Citiamo a tale proposito il ceppo n.9 della specie *Polytoma uvella* che sopporta ed assimila perfettamente l'acido caproico ad una concentrazione dell'1‰ (2‰ tossico), il ceppo n. 6 che può essere coltivato in acido caproico a 0,5‰ con ottimi risultati, mentre i ceppi n.5 e n. 7 risentono un netto effetto tossico ed una inibizione nella coltura con l'acido caproico adoperato alla concentrazione del 0,5‰: per tali ceppi l'assimilazione dell'acido caproico avviene a concentrazione del 0,2‰.

Non abbiamo delimitato con precisione per tutte le specie e per tutti gli acidi grassi sperimentati il limite di tossicità, ma ci siamo accontentati,

come abbiamo detto nella parte tecnica, di trovare una concentrazione che fosse sicuramente favorevole e non tossica. Durante questa ricerca di concentrazioni *optimum* noi abbiamo potuto rilevare, sempre in rapporto alle altre specie studiate, che alcune erano particolarmente sensibili all'effetto tossico degli acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio. Uno degli organismi più sensibili a tale proposito è *Astasia quartana*, che infatti risente di un effetto nettamente tossico con l'acido valerianico ad una concentrazione di 1‰, dell'acido caproico a 0,5‰; dell'acido eptilico a 0,25‰, dell'acido octilico a 0,1‰, ed abbiamo dovuto adoperare per mettere in evidenza il suo potere di assimilazione, tali acidi alle concentrazioni seguenti: acido valerianico e isovalerianico 0,5‰; acido caproico ed isocaproico 0,2‰; acido eptilico 0,1‰. Non otteniamo ancora dei risultati costanti con l'acido octilico a concentrazione del 0,07‰.

Un'altra specie particolarmente sensibile è *Chilomonas paramoecium*, per la quale l'acido nonilico in un primo tentativo è risultato tossico a 0,15‰; ma tale specie coltivata con risultati positivi nello stesso acido ad una concentrazione del 0,1‰, ha potuto essere portata, con esito positivo, alla concentrazione del 0,15‰. Con l'acido decilico a 0,07‰ ottenemmo una coltura solo dopo circa un mese di attesa. In susseguenti colture fatte a partire dal ceppo, non potemmo confermare tale risultato; ottenemmo colture in un mezzo nutritizio in cui l'acido decilico era aggiunto a 0,05‰. In conclusione non abbiamo potuto fino ad ora trovare una concentrazione adatta in cui avere risultati costanti e riproducibili in serie con tali acidi. Da segnalare il fatto, sempre per *Chilomonas paramoecium*, che l'acido miristico non sembra avere alcuna influenza tossica alla concentrazione del 0,07‰.

Da quanto è stato esposto si può concludere che gli organismi da noi studiati *presentano una sensibilità particolare verso gli acidi grassi a catena di atomi di carbonio più lunga di 5 atomi, che risultano tossici per date concentrazioni*. Si è potuto rilevare inoltre che *l'effetto di tossicità aumenta con l'aumentare del numero degli atomi di carbonio componenti la catena degli acidi grassi saturi da noi impiegati*.

\* \* \*

Se si considera l'aumento numerico degli individui nelle colture, ottenuto con l'assimilazione dei diversi acidi grassi, si potrà notare che mentre si ottengono con l'acido butirrico adoperato all'1‰ delle colture, nella maggior parte dei casi, più numerose di quelle ottenute al 2‰ con l'acido acetico, con l'acido valerianico invece, qualora esso sia assimilato, si ottengono risultati presso a poco uguali a quelli ottenuti con l'acido ace-

tico, ed infine con l'acido caproico si ottengono colture che sono molte volte inferiori a quelle ottenute con l'acido acetico. Gli acidi eptilico ed octilico, quando siano assimilati, danno un aumento numerico sempre inferiore a quello ottenuto con gli acidi acetico, butirrico e valerianico, però provocano sempre delle colture molto abbondanti. Gli acidi nonilico, decilico, laurinicico e miristicico (vedi tabella 36), quando vengono assimilati, lo sono in quantità decrescente via via che il numero degli atomi di carbonio aumenta.

Esempi tipici di tale fatto sono quelli forniti da *Polytoma ocellatum*, *Polytomella coeca*, *Astasia Chattoni*, *Euglena gracilis* var. *urophora*. Es-

TABELLA 36.

| Mezzo nutrizione base<br>(peptone 5 C . 4 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> ) | <i>Polytoma<br/>ocellatum</i><br>(stämme 2) | <i>Polytomella<br/>coeca</i> | <i>Chilomonas<br/>paramoecium</i> | <i>Astasia<br/>Chattoni</i> | <i>Euglena gracilis</i> | <i>Euglena gracilis</i><br>var. <i>urophora</i> |
|---|---|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---|
| senza acidi (controllo)   | — 260                                       | — 180                        | — 134                             | — 60                        | — 55                    | — 60  |
| + acido acetico 2 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                           | ++ 3530                                     | ++ 1340                      | + 480                             | ++ 380                      | ++ 440                  | ++ 435  |
| + acido butirrico 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                         | ++ 4700                                     | ++ 1600                      | ++ 805                            | ++ 550                      | ++ 550                  | ++ 580  |
| + acido caproico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | + 1500                                      | + 1015                       | + 530                             | + 355                       | + 310                   | + 386   |
| + acido eptilico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | ++ 2000                                     | + 1000                       | + 210                             | + 370                       | — 64                    | + 220   |
| + acido octilico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | ++ 2000                                     | + 1000                       | + 580                             | + 345                       | + 250                   | + 310   |
| + acido nonilico 0,15 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | + 1370                                      | + 700                        | + 300                             | + 235                       | + 176                   | + 175   |
| + acido decilico 0,07 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | + 1370                                      | + 660                        |                                   | + 160                       | + 209                   | + 154   |
| + acido laurinicico 0,07 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                    | + 1120                                      | + 535                        |                                   | + 148                       | + 172                   | + 162   |
| + acido miristicico 0,07 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                    | + 562                                       | — 240                        | + 264                             | + 162                       | + 136                   | + 159   |

sendo però molto limitato il numero degli organismi fino ad oggi studiati, che hanno la capacità di usare acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio, crediamo opportuno di avanzare per ora, solamente un'ipotesi di lavoro; che l'effetto sull'aumento numerico degli individui nelle colture e il grado d'assimilazione degli acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio diminuiscono con l'aumentare degli atomi di carbonio componenti la catena stessa.

\* \* \*

Se si considerano i dati forniti dallo studio delle esigenze trofiche delle specie studiate, si può osservare che sono assimilati con più facilità gli acidi aventi un numero pari di gruppi CH<sub>2</sub> che quelli aventi un nu-

mero dispari. Gli acidi aventi gruppi  $\text{CH}_2$  pari sono assimilati da un maggior numero di specie che quelli a numero impari; e gli isomeri a catena biforcata sono in generale utilizzati in maniera nettamente inferiore dei corrispondenti acidi a catena diretta.

Alcune specie poi sembrano nettamente preferire i composti aventi un numero pari di tali gruppi e non usufruiscono gli isomeri a catena biforcata. Ma dato che non esistono nette preferenze per tutte le specie e che finora si conoscono le esigenze trofiche di troppo poche specie non ci sembra opportuno trarre per ora delle conclusioni.

4) *Assimilazione degli alcool da parte degli oxi trofi.* — Nella parte speciale riguardante la nutrizione degli organismi studiati, via via mettemmo in evidenza che anche alcuni alcool potevano essere assimilati dai leucofiti e clorofiti sperimentalmente privati della funzione clorofilliana.

Nel corso delle sperimentazioni notammo che esisteva una certa concordanza di risultati fra alcool e acidi grassi aventi un numero uguale di atomi di carbonio. Questa concordanza in verità non era assoluta, cioè esistevano degli alcool corrispondenti a degli acidi grassi utilizzati, che non erano assimilati e alcool che erano assimilati mentre i corrispondenti acidi grassi non lo erano; in ogni modo là dove la concordanza si era verificata, essa doveva collegarsi ad una causa che soltanto incidentalmente durante i trapianti successivi potemmo conoscere. Notammo cioè che in tubi contenenti alcool non assimilati dagli organismi in istudio si sviluppava un forte odore di acidi grassi. Tale effetto ci fece pensare alla possibilità che questi organismi potessero ossidare gli alcool ad acidi grassi. L'odore di acido grasso era evidente specialmente nei tubi contenenti l'alcool isoamilico. Per meglio studiare questo interessante fenomeno, allestimo colture in bottiglie di Legroux. Il mezzo base adoperato fu il solito mezzo base al peptone pancreatico: l'alcool isoamilico fu adoperato alla percentuale di  $0,5\text{‰}$ . Inoculammo con delle colture di *Polytoma ocellatum*, che già erano al terzo passaggio in serie in alcool isoamilico ed incubammo le bottiglie di Legroux a  $23^\circ$  per 15 giorni.

Due bottiglie contenenti  $500\text{ cc.}^3$  dello stesso mezzo colturale, sterilizzato nello stesso modo, e al quale era aggiunta la stessa quantità di alcool isoamilico, furono incubate a  $23^\circ$  per 15 gorni, colle corrispondenti bottiglie di LEGROUX in cui si era inoculato *Polytoma ocellatum* e ci servirono da controllo.

Al termine di questi 15 giorni di incubazione, il liquido contenuto nelle bottiglie previamente inoculate, fu filtrato per eliminare i protozoi presenti ed analizzato per cura del Laboratorio di chimica delle fermen-

tazioni del Prof. SCHÖEN. Nel liquido colturale a cui era stato aggiunto l'alcool isoamilico ed entro il quale si erano sviluppati i *Polytoma*, si riscontrò la presenza di acido valerianico, mentre in quello in cui i *Polytoma* non erano stati inoculati non si riscontrò alcuna presenza di acido grasso.

A causa della piccola quantità di acido grasso presente nella coltura, non ci è stato possibile ottenere un'analisi più precisa, diretta a determinare se l'acido grasso a 5 atomi di carbonio fosse valerianico o iso-valerianico, così come, per ristrettezza di tempo a disposizione, non potemmo allestire nuove colture più abbondanti che permettessero l'analisi qualitativa.

Non notammo mai alcun odore di acido grasso nei tubi contenenti alcool etilico, propilico, butilico ed esilico, che sono assimilati dagli organismi da noi studiati, molto probabilmente perchè man mano che le piccole frazioni di alcool venivano ossidate ad acido grasso esse erano immediatamente usufruite per la sintesi delle sostanze idrocarbonate di riserva. D'altra parte nelle colture sviluppantesi in liquido nutritizio a cui erano stati aggiunti alcool non assimilati, l'odore di acido cominciava a farsi sentire solo dopo 8 o 10 giorni dal momento della semina: il che significa che l'ossidazione dell'alcool procede lentamente e l'acido grasso prodotto si accumula man mano che gli organismi si sono sviluppati nel mezzo. Dalla tabella annessa si potrà osservare che tre alcool: etilico, butilico ed esilico sono assimilati dai sei organismi da noi studiati; ora tali specie utilizzano pure per la sintesi delle sostanze idrocarbonate di riserva gli acidi acetico, butirrico e caproico. Esiste dunque in questo caso un perfetto parallelismo: gli alcool corrispondenti ad acidi grassi assimilati sono essi pure utilizzati nella sintesi carbonata. L'alcool propilico dà per la grande maggioranza delle specie, risultati simili e comparabili con quelli ottenuti con l'acido propionico ad eccezion fatta per *Chilomonas paramoecium* che secondo noi non assimilerebbe l'acido propionico ed al contrario sarebbe capace di assimilare leggermente l'alcool propilico. L'alcool isobutilico in modo generale si comporta come l'acido isobutirrico per tutte le specie studiate, eccezion fatta per *Polytomella coeca*, che non assimila l'acido isobutirrico ed è capace invece di assimilare l'alcool isobutilico.

Là dove però si trova la più grande discordanza di risultati fra l'alcool e corrispondente acido grasso, è coll'alcool amilico che non è assimilato da *Polytomella coeca*, *Astasia Chattoni*, *Euglena gracilis* ed *Euglena gracilis* var. *urophora* che, al contrario, assimilano bene l'acido valerianico; *Polytoma ocellatum* e *Chilomonas paramoecium* assimilano lievemente l'alcool amilico mentre assimilano bene l'acido valerianico.

È difficile trarre una netta conclusione dai risultati ottenuti; ma

però fin d'ora crediamo di poter affermare che *gli alcool*, dagli organismi da noi studiati, *sono assimilati solo dopo essere stati previamente ossidati ad acido grasso*. Ad affermare ciò, oltre al fatto sperimentale riscontrato (ossidazione di un alcool ad acido grasso), esiste una concordanza abbastanza significativa fra i risultati ottenuti cogli acidi acetico, butirrico e caproico e quelli ottenuti con gli alcool etilico, butilico ed esilico.

Comparazione dell'effetto degli acidi grassi e degli alcool TABELLA 37.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> ) | Polytoma<br>ocellatum | Polytomella<br>coeca | Chilomonas<br>paramoecium | Astasia<br>Chattoni | Euglena<br>gracilis | Euglena<br>gracilis<br>var. urophora |
|--|-----------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|
| + acido acetico  | ++                    | ++                   | +                         | ++                  | ++                  | ++                                   |
| + alcool etilico   | ++                    | ++                   | +                         | ++                  | ++                  | ++                                   |
| + acido propionico   | ++                    | +                    | —                         | +                   | ++                  | ++                                   |
| + alcool propilico   | ++                    | ++                   | ∓                         | ++                  | ++                  | +                                    |
| + acido butirrico  | ++                    | ++                   | ++                        | ++                  | ++                  | ++                                   |
| + alcool butilico  | ++                    | ++                   | +                         | ++                  | ++                  | ++                                   |
| + acido isobutirrico   | +                     | —                    | ∓                         | ∓                   | —                   | +                                    |
| + alcool isobutilico   | +                     | +                    | ∓                         | ∓                   | —                   | +                                    |
| + acido valerianico  | ++                    | ++                   | +                         | ++                  | ++                  | +                                    |
| + alcool amilico   | ∓                     | —                    | ∓                         | —                   | —                   | —                                    |
| + acido caproico   | +                     | +                    | +                         | +                   | +                   | ++                                   |
| + alcool esilico   | ++                    | +                    | +                         | ++                  | ++                  | +                                    |

Riguardo alla discordanza riscontrata fra l'effetto dell'acido valerianico e quello dell'alcool amilico per le specie studiate, ci sembra che l'ipotesi più razionale che si possa avanzare è che il campione d'alcool da noi adoperato fosse impuro; infatti *a priori* noi non vediamo alcuna ragione per cui proprio solo l'alcool amilico debba dare dei risultati discordanti con quelli ottenuti con l'acido valerianico.

D'altra parte però, mancando cognizioni precise sul modo come tali organismi ossidano ed assimilano gli alcool e gli acidi grassi, non v'è da sorprendersi di questi risultati discordanti. È anche possibile che gli

acidi grassi o gli alcool siano prima o durante la sintesi delle sostanze di riserva, scissi in composti aventi una catena a minor numero di atomi di carbonio di quella dell'acido usufruito.

Solo delle precise ricerche biochimiche aggiunte ad una sperimentazione biologica fatta con campioni di alcool e di acidi assolutamente puri, potranno portare luce sul meccanismo intimo della sintesi amilacea in questi organismi.

5) *Enzimi costitutivi ed enzimi adattativi.* — In questi ultimi anni si è avuta una serie di lavori sugli enzimi adattativi dei batteri e dei lieviti ma soltanto nel 1930 KARSTRÖM, studiando profondamente le relazioni che esistono fra la presenza di determinati idrati di carbonio nei mezzi colturali dei batteri e la produzione dei corrispondenti enzimi (carboidrasi), ha potuto dividere gli enzimi, seguendo le condizioni in cui erano prodotti, in due differenti gruppi. Secondo tale Autore sono *enzimi costitutivi* quelli che gli organismi costruiscono sempre indipendentemente dalla composizione del mezzo di coltura in cui sono coltivati e che perciò sembrano essere una parte essenziale della costituzione enzimatica degli organismi. Al contrario sarebbero *enzimi adattativi* quelli che gli organismi producono solo in seguito a stimolo; la loro produzione dipendendo dalla presenza di una sostanza particolare contenuta nel mezzo nutritizio in cui gli organismi si sviluppano. YUDKIN (1932) ha cercato di determinare, lavorando sui batteri del gruppo *coli*, se la produzione degli enzimi era dovuta alla selezione degli individui che potevano produrre l'enzima necessario per una sostanza data (le colture di batteri in generale non sono mai monofiletiche) o se esisteva veramente un adattamento. Questo Autore concludeva il suo lavoro riassumendo tutti i dati che gli facevano credere come giusta la seconda ipotesi; ma solamente STEPHENSON e STIKLAND (1932-33) hanno potuto dimostrare che in realtà si trattava di un vero e proprio adattamento, dato che in questo periodo il numero dei batteri presenti nei mezzi colturali rimaneva costante. Il potere di formare dei nuovi enzimi specifici (in presenza di una determinata sostanza) può anche avvenire senza moltiplicazioni cellulari.

Bisogna notare che gli enzimi adattativi nel senso KARSTRÖM sono formati solamente in presenza di una data sostanza e che quando questa sostanza non è più presente nel mezzo di coltura il potere di produrre l'enzima adattativo viene perso altrettanto facilmente di quanto è stato acquistato. Ma FILDÉS, GLADSTONE e KNIGHT (1933) hanno potuto adattare dei ceppi « exacting » a divenire « non exacting ». Le ricerche di questi Autori sono state fatte con *Bacterium typhosum* su parecchi ceppi che richiedevano in più di un mezzo base, composto dai sali minerali ne-

cessari, un sale d'ammonio e parecchi aminoacidi fra cui il triptofano era indispensabile (ceppi « exacting »).

Questi autori con dei passaggi in serie in mezzi base + sali d'ammonio aventi delle quantità sempre più deboli di triptofano arrivarono ad adattare i ceppi di *Bacterium typhosum* a svilupparsi in un mezzo avente come sola fonte azotata un sale d'ammonio (ceppi « non exacting »). Dato che questa formazione di un enzima necessario all'assimilazione di sali d'ammonio si fece in presenza di sali d'ammonio bisognerebbe considerare questo enzima come adattativo. Ma se si considera, come lo fa notare KNIGHT (1937), che il periodo di adattamento è estremamente più lungo in confronto a quello corrispondente necessario alla produzione di un enzima adattativo, che il potere di produrre questo enzima occorrente all'assimilazione dei sali d'ammonio una volta acquisito non è facilmente preso, si vede che ci sono delle differenze fra gli enzimi adattativi nel senso KARSTRÖM e questo enzima necessario alla assimilazione dei sali di ammonio.

D'altra parte bisogna ricordare che secondo l'evoluzione fisiologica della nutrizione azotata la possibilità di assimilare un sale d'ammonio è considerata come un carattere più primitivo che l'assimilazione degli aminoacidi. KNIGHT conclude che secondo lui sarebbe questo un caso di *reversione* a un metabolismo più primitivo, cioè di nuova produzione di un enzima che gli organismi primitivamente possedevano. Noi abbiamo nella parte speciale della nutrizione di *Polytoma obtusum* fatto notare che esisteva anche in un leucofita la formazione, attraverso un periodo di adattamento, di enzimi in presenza del substrato corrispondente. Sarà opportuno però ricordare i fatti della sperimentazione per rendere più comprensibile l'esposto. Ambedue i ceppi di *Polytoma obtusum* durante una permanenza più o meno lunga nel mezzo nutritizio base sprovvisto di acidi grassi perdono la possibilità di sintetizzare direttamente l'enzima necessario all'assimilazione dell'acido butirrico. Ambedue i ceppi al momento dell'isolamento erano capaci di assimilare direttamente l'acido butirrico senza alcun periodo di adattamento. Attualmente il ceppo LWOFF dopo 12 anni di coltura in un mezzo base sprovvisto di acidi grassi ha bisogno di un periodo di adattamento variante dai 60 ai 110 giorni, per sintetizzare l'enzima necessario all'assimilazione dell'acido butirrico; il ceppo PROVASOLI dopo 2 anni di permanenza in un mezzo nutritizio base sprovvisto di acidi grassi, ha bisogno di un periodo di adattamento di 27-30 giorni.

Si deve dunque notare che esiste una relazione fra la durata del periodo di adattamento e la permanenza del ceppo in un mezzo sprovvisto di acidi grassi. Si può quindi arguire che probabilmente alla lunga il potere di assimilare l'acido butirrico possa essere perso, cioè quando il

periodo di adattamento necessario per fabbricare questo enzima sia così lungo che la morte dei flagellati, nelle colture adattative, sopravverrà prima che gli organismi si siano adattati a produrre l'enzima necessario per l'assimilazione di tale acido grasso. Per le modalità colle quali avviene la produzione di questo enzima bisognerebbe considerarlo come un enzima adattativo (nel senso KARSTRÖM) poichè esso si forma in presenza della sostanza specifica a cui tale enzima è deputato, e poichè esso è prodotto dagli organismi solamente in seguito ad uno stimolo. Bisogna però ricordarsi che *Polytoma obtusum* al momento dell'isolamento possedeva la facoltà di assimilare direttamente l'acido butirrico, cioè aveva l'enzima necessario per tale funzione.

Ci sembra dunque che il nostro caso si possa paragonare a quello constatato da FILDES, GLADSTONE e KNIGHT, che secondo l'opinione di KNIGHT dovrebbe piuttosto ascriversi ad una reversione o ritorno alla produzione di un enzima che gli organismi primitivamente possedevano. Noi pure consideriamo la formazione dell'enzima necessario all'assimilazione dell'acido butirrico, da parte di *Polytoma obtusum*, come la nuova produzione, attraverso ad un periodo di adattamento, di un enzima che primitivamente tale organismo possedeva. D'altra parte noi abbiamo potuto sperimentalmente adattare *Polytoma obtusum* a produrre l'enzima necessario all'assimilazione dell'acido caproico, come abbiamo fatto notare nella parte speciale della nutrizione di tale specie. Sembra che il fatto di adattarsi ad assimilare l'acido caproico sia strettamente legato ad un previo adattamento all'assimilazione dell'acido butirrico. Infatti col ceppo PROVASOLI il periodo di adattamento necessario all'assimilazione dell'acido caproico, qualora si parta da colture già adattate all'assimilazione dell'acido butirrico, è di 15 giorni; se invece si parte da colture coltivate in acido acetico, il periodo di adattamento all'acido caproico è molto più lungo cioè di 69 giorni. Per il ceppo LWOFF, partendo da colture già adattate all'acido butirrico, il periodo di adattamento all'acido caproico è di 30 giorni; se si parte da colture in acido acetico, il periodo di adattamento, posto che sia possibile ottenerlo, è molto più lungo: attualmente dopo 110 giorni non si sono ancora ottenute colture in acido caproico. Può darsi dunque che per il ceppo LWOFF sia necessario assolutamente partire da colture previamente adattate all'acido butirrico, poichè il periodo di adattamento può essere così lungo che i flagellati presenti nelle colture adattative muoiono prima di essersi adattati a fabbricare l'enzima necessario all'assimilazione dell'acido caproico. Tale enzima può essere considerato come enzima adattativo nel senso KARSTRÖM; rimane però da spiegare come mai sia necessaria o favorevole una preadattazione all'assimilazione dell'acido butirrico.

È ciò che ci proponiamo di chiarire nelle prossime esperienze.

COMPARAZIONE DEI CARATTERI FISIOLGICI  
DELLA NUTRIZIONE CARBONATA DEI FLAGELLATI STUDIATI

*Polytoma*. — Il genere *Polytoma* è quello che fino ad ora è stato meglio studiato: si sono potuti isolare in colture batteriologicamente pure quattro specie e ciascuna di queste è stata studiata con un numero di ceppi vari. Lo studio fisiologico della nutrizione delle specie *Polytoma obtusum* e *Polytoma ocellatum* è basato infatti sulle ricerche

Genere *Polytoma* - Fattori di crescita - Risultati di LWOFF e DUSI (1938) TABELLA 38.

| Specie              | Mezzo base<br>(acetato ammonio 1 <sup>o</sup> / <sub>00</sub><br>+ calcio e ferro) | Mezzo base (acetato am-<br>monio + calcio e ferro)<br>+ thiazolo |
|---------------------|--|--|
| <i>P. uvella</i>    | +  | +  |
| <i>P. obtusum</i>   | +  | +  |
| <i>P. caudatum</i>  | 0  | +  |
| <i>P. ocellatum</i> | 0  | +  |

fatte con due ceppi; *Polytoma caudatum* sulle ricerche eseguite su tre ceppi e *Polytoma uvella* sulle ricerche vertenti otto ceppi. Il fatto di aver potuto ottenere ceppi derivanti da località e ambienti naturali diversi, con risultati fisiologici perfettamente identici, ci permise non solo di poter concludere che esiste una stabilità nei caratteri fisiologici, ma che questi possono considerarsi sicuri e ben provati anche perchè lo studio di ogni ceppo venne eseguito con una tecnica basata su numerosi controlli.

Consideriamo ora i punti comuni e le differenze esistenti nel genere *Polytoma* riguardo alla nutrizione azotata ed alla nutrizione carbonata. Dalla tabella acclusa si potrà notare che esistono due specie, *Polytoma uvella* e *Polytoma obtusum*, che hanno un esteso potere di sintesi nella nutrizione azotata: essi possono realizzare la sintesi dei loro costituenti protoplasmatici partendo da sali d'ammonio. Questi due organismi, come è stato dimostrato da LWOFF e DUSI (1938) qualora siano posti in mezzi contenenti i sali necessari di ferro, calcio, magnesio, potassio e sodio, non hanno alcun bisogno di fattori di crescita.

Al contrario le specie *Polytoma caudatum*, e *Polytoma ocellatum* che possono ambedue realizzare la sintesi massima nella nutrizione azotata, partendo esse pure da sali d'ammonio, hanno bisogno di un fattore di crescita: il tiazolo (4-metil-5  $\beta$  idroxiethyltiazolo). Queste due specie dunque hanno perso il potere di sintetizzare il tiazolo che al contrario *Polytoma obtusum* e *Polytoma uvella* possiedono ancora.

Inoltre *Polytoma ocellatum* presenta riguardo alla nutrizione azotata un potere di sintesi finora sconosciuto nei leucofiti; tale organismo in presenza del necessario fattore di crescita (tiazolo), può assimilare perfettamente anche un nitrato e partire da questo sale inorganico per realizzare la sintesi dei propri costituenti citoplasmatici azotati. È questo il primo esempio di un leucofita che faccia una sintesi così completa nella nutrizione azotata.

La comparazione dei caratteri fisiologici della nutrizione carbonata delle quattro specie del genere *Polytoma* è estremamente interessante poichè ognuna delle specie rappresenta una tappa di potere ossidativo diversa.

Dei generi fino ad oggi studiati è infatti solamente il genere *Polytoma* che comprenda specie aventi così diverse potenzialità di ossidazione. La specie che nella fisiologia della nutrizione carbonata possiede il potere più specializzato di sintesi è *Polytoma obtusum*. Tale specie come abbiamo detto nella parte monografica, attualmente può assimilare direttamente solo l'acido acetico; l'assimilazione dell'acido butirrico che in ambedue i ceppi al momento dell'isolamento avveniva direttamente, attualmente si ottiene solo dopo un previo periodo di adattamento (l'enzima è adattativo secondo la definizione di KARSTRÖM e si forma in presenza della sostanza che deve essere assimilata).

Non si tratta qui di una scomparsa di funzione vera e propria, poichè con un periodo adattativo noi possiamo ripristinare la funzione che al momento dell'isolamento esisteva, ma di una attenuazione della velocità di produzione di un enzima necessario. *Polytoma caudatum* assimila bene direttamente sia l'acetato che il butirrato, è incapace di assimilare acidi grassi superiori al butirrico e gli alcool, ed ha quindi la possibilità di realizzare la sintesi delle sue riserve idrocarbonate partendo da due soli acidi organici. *Polytoma uvella* può assimilare direttamente molto bene alcuni acidi grassi il cui termine superiore è l'acido caproico; l'acido octilico è il termine più alto che *Polytoma uvella* può ancora assimilare ma in quantità molto minore dell'acido caproico; tale specie è però incapace di fare la sintesi delle sue sostanze idrocarbonate di riserva a partire da acidi a catena più lunga dell'acido octilico e dagli alcool; essa presenta quindi la possibilità di poter usufruire di un più largo numero di acidi organici. *Polytoma ocellatum*

è la specie del genere *Polytoma* che ha il più esteso potere ossidativo: può sintetizzare le sue riserve idrocarbonate partendo da quasi tutti gli acidi grassi inferiori (l'acido grasso a catena più lunga assimilato è l'acido laurinic) e da parecchi alcool.

Genere *Polytoma* - Acidi grassi e alcool. TABELLA 39.

| Mezzo nutrizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> ) | <i>Polytoma</i><br>caudatum | <i>Polytoma</i><br>obtusum | <i>Polytoma</i><br>uvella | <i>Polytoma</i><br>ocellatum |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| senza acidi (controllo)  | —                           | —                          | —                         | —                            |
| + acido acetico  | ++                          | ++                         | ++                        | ++                           |
| + acido propionico   | —                           | —                          | —                         | ++                           |
| + acido butirrico  | +                           | ++                         | ++                        | ++                           |
| + acido isobutirrico   | —                           | —                          | —                         | +                            |
| + acido valerianico  | —                           | —                          | ++                        | ++                           |
| + acido isovalerianico   | —                           | —                          | —                         | +                            |
| + acido caproico   | —                           | —                          | ++                        | +                            |
| + acido isocaproico  | —                           | —                          | +                         | +                            |
| + acido eptilico   | —                           | —                          | —                         | ++                           |
| + acido octilico   | —                           | —                          | ±                         | ++                           |
| + acido nonilico   | —                           | —                          | —                         | +                            |
| + acido decilico   | —                           | —                          | —                         | +                            |
| + acido laurinic   | —                           | —                          | —                         | +                            |
| + acido miristico  | —                           | —                          | —                         | ±                            |
| + alcool etilico   | —                           | —                          | —                         | ++                           |
| + alcool propilico   | —                           | —                          | —                         | ++                           |
| + alcool butilico  | —                           | —                          | —                         | ++                           |

*Euglene ed Astasie.* — Noi consideriamo utile comparare le caratteristiche fisiologiche delle Astasie con quelle delle Euglene poichè morfologicamente è ormai generalmente ammessa la derivazione per perdita di pigmento assimilatore delle Astasie (flagellati incolori) dalle Euglene (flagellati a clorofilla). Non abbiamo fatto una analoga comparazione dei caratteri fisiologici fra i *Polytoma* e i *Chlamydomonas*

da cui i primi derivano per perdita del pigmento assimilatore, poichè se i *Chlamydomonas* possono essere coltivati all'oscurità in assenza della funzione clorofilliana, essi però non perdono il potere di sintetizzare anche all'oscurità la clorofilla e poichè gli Autori che eseguirono le ricerche su tale specie non provarono che una serie molto limitata di

Genere *Euglena* e *Astasia*

TABELLA 40.

| Mezzo nutritizio base<br>(peptone 5 C. 4 <sup>o</sup> / <sub>100</sub> ) | <i>Euglena gracilis</i> | <i>Euglena gracilis</i> var. <i>urophora</i> | <i>Astasia Chattoni</i> | <i>Astasia quartana</i> |
|--|-------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| senza acidi (controllo)  | —                       | —  | —                       | —                       |
| + acido acetico 2 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                          | ++                      | ++   | ++                      | ++                      |
| + acido propionico 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | ++                      | ++   | +                       | ++                      |
| + acido butirrico 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                        | ++                      | ++   | ++                      | ++                      |
| + acido isobutirrico 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                     | —                       | +  | ∓                       | ∓                       |
| + acido valerianico 0,5 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                    | ++                      | +  | ++                      | ++                      |
| + acido isovalerianico 0,5 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                 | —                       | —  | —                       | ∓                       |
| + acido caproico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                      | +                       | ++   | +                       | +                       |
| + acido isocaproico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                   | ∓                       | ∓  | ∓                       | +                       |
| + acido eptilico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                      | —                       | +  | +                       | +                       |
| + acido octilico 0,15 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                      | +                       | +  | +                       | +                       |
| + acido nonilico 0,08 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                      | +                       | ∓  | +                       | +                       |
| + acido decilico 0,07 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                      | +                       | ∓  | ∓                       | +                       |
| + acido laurilico 0,07 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                     | +                       | ∓  | ∓                       | +                       |
| + alcool etilico 2 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                         | ++                      | ++   | ++                      | —                       |
| + alcool propilico 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                       | ++                      | +  | ++                      | —                       |
| + alcool butilico 1 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                        | ++                      | ++   | ++                      | —                       |
| + alcool esilico 0,25 <sup>o</sup> / <sub>100</sub>                      | ++                      | +  | ++                      | —                       |

acidi grassi ed organici e non esiste quindi il materiale necessario ad una comparazione fra i due generi.

*Euglena gracilis* e *Euglena gracilis* var. *urophora* sono finora i due unici esemplari di clorofiti che coltivati all'oscurità perdono almeno temporaneamente, il potere di sintetizzare la loro clorofilla. BAKER, d'altra parte, che ha eseguito morfologicamente l'effetto della mancanza

di luce su *Euglena gracilis*, conclude che all'oscurità quando avvengono divisioni vegetative i cromatofori di *Euglena* si sminuzzano in parecchi piccoli leucoplasti. In realtà dunque nelle condizioni sperimentali in cui si è agito *Euglena gracilis* coltivata all'oscurità possiede caratteri morfologici corrispondenti a quelli dei leucofiti; assenza (temporanea) di pigmento assimilatore e presenza di leucoplasto.

Come si potrà osservare dalla tabella annessa (n. 40) i caratteri della nutrizione carbonata di *Euglena gracilis* e di *Euglena gracilis* var. *urophora* sono estremamente simili a quelli di *Astasia Chattoni* e vi sono pure molti punti di somiglianza con *Astasia quartana*, nonostante questa presenti il potere di assimilare un minor numero di acidi organici. *Astasia quartana* non è capace di assimilare gli alcool e in ciò si differenzia da *Astasia Chattoni* e dalle due *Euglene gracilis*.

Noi non abbiamo potuto finora ottenere risultati costanti con l'acido octilico; nella parte speciale relativa ad *Astasia quartana* abbiamo fatto notare che tale organismo è estremamente sensibile alla tossicità degli acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio; tale difficoltà pratica ci ha impedito durante il corso delle presenti esperienze di poter sapere se tale specie assimila o no gli acidi grassi a catena più lunga di 8 atomi di carbonio.

Rimane però assodato che *Astasia quartana* non può assimilare gli alcool.

*Hyalogonium* e *Chlorogonium*. — Le specie finora studiate sono: *Hyalogonium Klebsii*, *Chlorogonium euchlorum* e *Chlorogonium elongatum*. Come è stato detto nella parte speciale, finora sono ancora controversi i risultati ottenuti con i due *Chlorogonium* e i risultati ottenuti da Pringsheim per *Hyalogonium* non sono finora stati controllati da altri autori.

Basandoci però sui risultati finora ottenuti si può concludere che nella nutrizione carbonata essi si comportano in un modo simile: *Chlorogonium euchlorum* e *Hyalogonium Klebsii* assimilano ambedue solamente l'acido acetico e sono incapaci di assimilare altri acidi grassi e gli alcool. *Chlorogonium elongatum* fu studiato solo da LOEFER; i risultati ottenuti si prestano alle critiche da noi fatte nella parte speciale, però a valutazione fatta dei risultati, si può ammettere che gli acidi acetico e butirrico siano assimilati da tale specie.

*Tappe di potere ossidativo nella nutrizione carbonata*. — Radunando ora le specie aventi gli stessi caratteri fisiologici nella nutrizione daremo uno sguardo riassuntivo al complesso dei dati ottenuti.



1) *Hyalogonium Klebsii* e *Chlorogonium euchlorum* possono solo assimilare l'acido acetico;

2) *Polytoma obtusum* può assimilare direttamente solo l'acido acetico; adattativamente l'acido butirrico e l'acido caproico;

3) *Polytoma caudatum* var. *astigmata*, *Chlamydomonas agloëformis*, *Chlorogonium elongatum* assimilano l'acido acetico e il butirrico;

4) *Polytoma uvella* e *Astasia quartana* assimilano parecchi degli acidi grassi compresi fra l'acetico e l'octilico;

5) *Polytoma ocellatum*, *Polytomella coeca*, *Chilomonas paramoecium*, *Euglena gracilis*, *Euglena gracilis* var. *urophora* ed *Astasia Chattoni*, assimilano molti degli acidi grassi compresi fra l'acido acetico e l'acido laurinicico e parecchi alcool.

Come fece notare LWOFF (1935) e PRINGSHEIM (1937) l'acido acetico è il solo acido assimilato da tutti i leucofiti e clorofiti privati della funzione clorofilliana. Poi esistono degli organismi che sono capaci di assimilare man mano un numero più grande di acidi grassi e gli alcool. Come si potrà osservare dalla tabella comparativa (n. 41) gli organismi che possono assimilare un acido grasso avente una catena composta di un numero determinato di atomi di carbonio, possono assimilare anche altri acidi grassi aventi un minor numero di atomi di carbonio nella catena. Non si è potuto finora osservare il contrario cioè organismi che possono assimilare solamente acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio e non acidi grassi a corta catena di atomi di carbonio. Se noi consideriamo il prodotto finale dell'assimilazione delle sostanze carbonatate che in questi microorganismi è l'amido e che, come risulta dalle ricerche di PRINGSHEIM e di LWOFF, gli acidi grassi servono alla sintesi delle sostanze idrocarbonate di riserva e sono alimento specifico del leucoplasto, ci si renderà conto che gli organismi in questione partendo da sostanze organiche molto poco ossidate sintetizzano un composto come l'amido che è molto ossidato. Bisogna dunque considerare che una gran parte del lavoro speso in questa sintesi sia una ossidazione, che in certi casi deve essere minimo o nullo mentre in tal'altri è massimo: minimo o nullo per composti come l'acido acetico (l'acido grasso più ossidato fra quelli assimilati), massimo nei casi dell'assimilazione di acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio come l'acido laurinicico e l'alcool esilico. Che si tratti di una ossidazione ci pare un fatto sicuro poichè oltre alla considerazione che il prodotto finale di questa sintesi (amido) è un prodotto molto più ossidato degli acidi grassi assimilati, noi potremmo provare che gli alcool sono assimilati sotto forma di acidi grassi, cioè essi sono previamente ossidati ad acido grasso corrispondente. Se si accetta il presupposto che la sintesi dell'amido da parte dei leucofiti e dei clorofiti sperimentalmente privati della funzione clorofilliana sia un'ossida-

zione per la quasi totalità degli acidi grassi, le quattro tappe della nutrizione carbonata devono essere considerate come quattro differenti potenzialità di potere ossidativo. Noi vediamo che tale concezione è convalidata dai fatti fino ad oggi osservati:

1) l'acido acetico che è l'acido più ossidato fra quelli assimilati è l'unico acido che può essere assimilato da tutti i leucofiti e clorofiti sperimentalmente privati della assimilazione clorofilliana.

2) Gli organismi che sono capaci di ossidare acidi grassi molto ridotti sono capaci di ossidare acidi grassi meno ridotti mentre non possono compiere delle ossidazioni al di là di un certo limite (organismi che assimilano l'acido laurinicico possono assimilare l'octilico, il caproico, il butirrico e l'acetico e al contrario nessun organismo è capace di assimilare acidi come laurinicico e l'octilico e non assimilare l'acido acetico). Le tappe di potere ossidativo da noi osservate corrispondono a tappe di successive perdite di tale potere. Ciò ci sembra ben confermato da due considerazioni principali. *Euglena gracilis* ed *Euglena gracilis* var. *urophora* sono due clorofiti che nelle condizioni sperimentali in cui furono coltivati sono perfettamente comparabili ad un leucofita divenuto tale di recente data. Questi clorofiti coltivati nell'oscurità perdono il potere di sintetizzare la loro clorofilla e secondo le ricerche di BAKER i cloroplasti di *Euglena gracilis* quando intervengono divisioni cellulari al buio si spezzettano in piccoli filamenti che secondo tale Autore sono da considerarsi dei leucoplasti. Questi clorofiti dunque coltivati all'oscurità sono morfologicamente simili a dei leucofiti (assenza di clorofilla, presenza di un leucoplasto e di riserve glucidiche figurate). Fisiologicamente rispetto alla nutrizione carbonata essi hanno un largo potere ossidativo essendo capaci di assimilare acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio e di alcool.

Inoltre esiste pure il fatto che *Polytoma obtusum* ha perso temporaneamente in soli dodici anni di coltura in mezzi sprovvisti di acidi grassi il potere di assimilare direttamente l'acido butirrico. Con un periodo di adattamento ci fu possibile ripristinarlo in tale funzione.

Nonostante che al momento dell'isolamento dei due ceppi di *Polytoma obtusum* nessuno dei due assimilasse l'acido caproico, ci fu possibile adattare ambedue i ceppi alla produzione dell'enzima necessario o direttamente da un ceppo coltivato in acetato o passando per un previo adattamento in acido butirrico. Al tempo dell'isolamento noi non sospettavamo ancora che esistesse la possibilità di far produrre degli enzimi adattativamente e non abbiamo fatta alcuna esperienza in proposito. Ciò nonostante ci sembra molto probabile che come lo è per la produzione dell'enzima necessario all'assimilazione dell'acido butirrico.

anche la produzione dell'enzima necessario all'assimilazione dell'acido caproico sia una riproduzione di un enzima primitivamente esistente.

Questi fatti seguiti sperimentalmente ci provano che esiste realmente la possibilità di perdere man mano alcuni degli enzimi necessari all'assimilazione degli acidi grassi meno ossidati, e che vengono persi per ultimi gli enzimi necessari ad assimilare gli acidi che sono, considerati in rapporto cogli altri, i più ossidati.

Per ora tale perdita è temporanea cioè la funzione è ripristinabile mediante un periodo di adattamento che varia però a seconda della durata della permanenza in mezzi sprovvisti di acidi grassi. Fatalmente tale perdita diventerà definitiva quando il tempo di adattamento sarà così lungo che la morte dei protozoi sopravverrà prima che gli organismi si siano adattati a produrre l'enzima necessario all'assimilazione degli acidi a cui sono deputati. Un clorofita, che sperimentalmente va considerato come un leucofita primitivo, è caratterizzato nella sua nutrizione carbonata da un largo potere ossidativo. Un leucofita seguito in coltura dimostra che è possibile la perdita degli enzimi che servono a tali ossidazioni e che ultima ad essere persa è la possibilità di assimilare il composto più ossidato, quindi che i poteri ossidativi si possono man mano perdere. Ambedue questi fatti sperimentali stanno a dimostrare che nei leucofiti il carattere primitivo della nutrizione carbonata è quello di ossidare un gran numero di acidi grassi anche molto ridotti e gli alcool, e che esistono delle perdite di potere ossidativo gradualmente di cui per primi sorprendemmo alcune tappe.

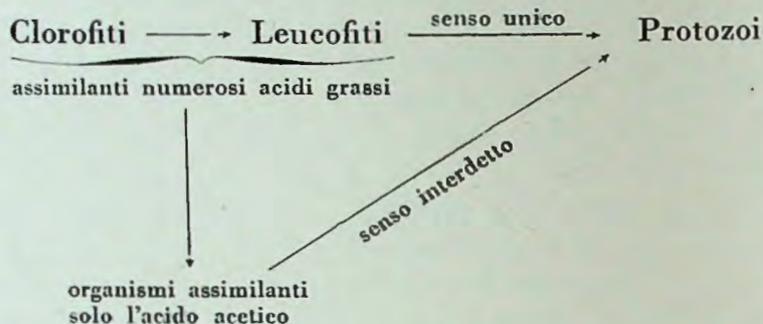
Ciò indica che nei leucofiti esiste un'evoluzione nella nutrizione carbonata, evoluzione che segue il senso: assimilazione alcool-acidi grassi a 12 atomi di carbonio  $\longrightarrow$  assimilazione di acidi aventi 8-6 atomi di carbonio  $\longrightarrow$  assimilazione di acidi a 4 atomi di carbonio  $\longrightarrow$  assimilazione di un solo acido, quello a 2 atomi di carbonio (sempre riferendoci alla potenzialità massima di ossidazione). Tale evoluzione particolare e ristretta ai leucofiti e alla nutrizione carbonata si dovrebbe chiamare più propriamente una specializzazione a vita in un ambiente a condizioni molto limitate e speciali.

Riguardo perciò alla evoluzione di clorofiti  $\longrightarrow$  leucofiti  $\longrightarrow$  protozoi il caso particolare della nutrizione carbonata (finora ristretta se ci si basa sui dati di fatto, a specie del genere *Polytoma*) si deve considerare come facente capo a delle specie che per le loro caratteristiche trofiche non hanno alcun avvenire nell'evoluzione tendente verso gli animali.

Evidentemente l'evoluzione dei leucofiti tende verso i protozoi (animali) e ciò è stato provato oramai dai lavori di molti morfologi. Il nostro studio permette però d'asserire che ciò è vero probabilmente solo per

certe serie di specie; per altre si ha una evoluzione particolare che tende verso una specializzazione tale di esigenze trofiche che le specie più evolute si trovano ad essere così legate al fattore ambiente specifico, da sembrare destinate a scomparire di fronte anche a minimi cambiamenti delle condizioni ambientali.

Lo schema generale dell'evoluzione dei protozoi sarebbe quindi rappresentabile nel modo seguente:



Come già concluse LWOFF (1938) solo i clorofiti o i leucofiti aventi un basso coefficiente di oxi-trofia e assimilanti un gran numero di acidi grassi e alcool, cioè organismi dotati di grande potere ossidativo, possono dar luogo ad una evoluzione verso gli animali (protozoi *sensu stricto*). A lato di questa vera evoluzione esiste per la nutrizione carbonata una speciale evoluzione che può portare ad organismi aventi un ridottissimo e specializzato potere ossidativo, e alla creazione di serie di specie che non hanno alcun avvenire, che sono fine a sè stesse e rappresentano un binario morto nel processo evolutivo.

## CONCLUSIONI

1) Le seguenti specie sono state studiate nelle loro esigenze trofiche rispetto alla nutrizione carbonata: *Polytoma uvella*, *Polytoma obtusum*, *Polytoma caudatum* var. *astigmata*, *Polytoma ocellatum*, *Polytomella coeca*, *Chilomonas paramoecium*, *Euglena gracilis*, *Euglena gracilis* var. *urophora*, *Astasia Chattoni*, *Astasia quartana*.

2) Abbiamo potuto constatare che esiste realmente una stabilità dei caratteri fisiologici della nutrizione e che tali caratteri là dove i caratteri morfologici non sono netti e ben definibili possono essere di prezioso aiuto per la determinazione della specie.

3) La zona di pH favorevole non è un carattere stabile.

4) Confermiamo LWOFF e DUSI sulla possibilità di una completa indipendenza fra il potere di sintesi (esigenze azotate) e la nutrizione carbonata.

5) Con prove di non-tossicità noi potemmo mettere in evidenza il carattere tossico degli acidi grassi a lunga catena di atomi di carbonio; alcune specie sono particolarmente sensibili a tale effetto tossico.

6) L'effetto di tossicità aumenta parallelamente all'aumento del numero degli atomi di carbonio componenti la catena degli acidi grassi saturi.

7) L'assimilabilità degli acidi grassi impiegati diminuisce col l'aumentare della lunghezza della catena degli atomi di carbonio.

8) Non esistono nette preferenze nell'assimilazione degli acidi grassi: la maggior parte delle specie assimila gli acidi grassi a numero pari di gruppi  $\text{CH}_2$  ma anche i composti a numero impari e gli isomeri a catena biforcata possono essere assimilati.

9) Parecchie specie hanno il potere di assimilare alcuni alcool; tali composti possono essere ossidati ad acidi grassi prima di essere usufruiti per la nutrizione carbonata.

10) Abbiamo potuto dimostrare che anche flagellati leucofiti possono adattativamente produrre degli enzimi e precisamente enzimi ossidativi.

11) Colla comparazione dei risultati ottenuti dallo studio delle specie abbiamo potuto determinare quattro tappe di successive perdite di potere ossidativo nella nutrizione carbonata, perdite che caratterizzano una serie di unicellulari che si sono staccati dalla linea evolutiva leucofiti —→ protozoi in senso stretto, specializzandosi in una nutrizione carbonata che richiede il minimo sforzo ossidativo.

## BIBLIOGRAFIA

- BOS A. 1933 — *Ueber Trichomoniasis bei Tauben* - Centr. f. Bakter. Bd. 126, p. 550, e Bd. 130, pag. 220.
- BAKER C. L. 1933 — *Studies on the cytoplasmic components of Euglena gracilis* - Arch. f. Prot. Bd. 80, pag. 434.
- BARKER A. 1935 — *The metabolism of the colorless alga, Prototheca zopfii* - Jour. of Cell. and Comp. Physiol., Vol. 7, p. 73.
- BARKER A. 1935 — *The oxidative metabolism of the colorless alga, Prototheca zopfii* - Jour. of Cell. and Comp. Physiol., Vol. 8, p. 231.
- BÜTSCHLI 1889 — *Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs* - Bd. I e II Protozoa.
- CHADEFAUD et PROVASOLI L. 1938 — *Une nouvelle Euglène graciloïde: Euglena gracilis Klebs var. urophora n. var.* - Arch. Zool. Exper. Protistologica 1938.
- 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, p. 424.
- CAILLEAU R. 1936 — *L'activité de quelques stérols 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.
- CAILLEAU R. 1937 — *La nutrition des Flagellés Tetramitidés* - Ann. Inst. Pasteur, Vol. 59.
- 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 zygogènes et azygogènes. Zygoose bactérienne et zygoose saline* - C. R. Soc. Biol., T. 93, p. 675.

CHATTON E. e CHATTON M. 1929 — *Les conditions de la conjugaison du Glaucoma scintillans en cultures léthobactériennes. Action directe et spécifique de certains agents zyogènes.* - 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. 1916 — *Polytomella agilis* - Zool. Anzeig., Bd., 40, p. 273.

DOFLEIN F. 1917 — *Rhizochrysis eine Uebergangsform unter den niederen Protozoen* - Zool. Jahr. Abt. f. Morph., Bd. 48, p. 383.

DOFLEIN F. 1918 — *Studien zur Naturgeschichte der Protozoen* - Zool. Jahrb. An., Bd. 41, p. 112.

DOFLEIN F. 1922 — *Untersuchungen über Chrysomonadinen I* - Arch. f. Prot., Bd. 44, p. 149.

DOFLEIN F. 1923 — *Untersuchungen über Chrysomonadinen II* - Arch. f. Prot. Bd. 46, p. 328.

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 Euglènes.* - C. R. Soc. Biol., T. 107, p. 1232.

DUSI H. 1933 — *Recherches sur la nutrition de quelques Euglènes* - 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.

DUSI H. 1937 — *Le besoin de substances organiques de quelques Euglènes à chlorophylle* - Arch. f. Prot., Bd. 89, p. 94.

ELLIOT A. 1933 — *Isolation of Colpidium striatum bacteriafree 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. f. 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. f. Protist., Bd. 84, p. 472.

FILDES P. e GLASTONE G. B. e KNIGHT B. C. J. G. 1933 — Brit. J. exp. Path., Vol. 14, p. 189

GLASER R. e CORIA N. 1930 — *Methods for the pure culture of certain Protozoa* - Journ. of exp. Medic., V. 51, p. 787.

GLASER R. e CORIA N. 1935 — *The culture of Paramoecium caudatum free from living microorganisms* - Journ. of Parasitology, Vol. 20, p. 33.

GLASER R. e CORIA N. 1935 — *The culture and reactions of Purified Protozoa* - Americ. Journ. of Hygiene, Vol. 21, p. 111.

GRANDORI R. e L. — *Studi sui Protozoi del terreno* - Ann. R. Ist. Sup. Agr., Vol. I, fasc. 3°.

GRANDORI L. — *Morfologia, stadi di sviluppo e presenza di un carotinoide nel Polycoma caudatum* - Boll. Lab. Zool. Agr., Vol. VI.

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.

HALL R. P. 1933 — *The question of the ingestion of solid particles by Euglena* - Trans. of the Am. Micr. Soc., Vol. 52, p. 220.

HALL R. P. 1933 — *On the relations of hydrogen-ion concentration to the growth of Euglena anabaena var. minor and Euglena deses* - Arch. f. Protist. Bd. 79, p. 239.

HALL R. P. 1934 — *Effects of carbohydrates on the growth of Euglena anabaena var. minor in darkness.* - Arch. f. Protist. Bd. 82, p. 45.

HALL R. P. e ELLIOT A. M. 1935 — *Growth of Colpidium in relation to certain incomplete proteins and amino acids.* - Arch. f. Protist, Bd, 85, p. 443.

HALL R. P. e JOHNSON e LOEFER 1935 — *A method for counting Protozoa in the mesurement of growth under experimental conditions* - Trans. Micr. Soc., Vol. 54, p. 298.

HALL R. P. e LOEFER J. B. 1936 — *Effect of ethyl alcohol on the growth of eight protozoan species in bacteria-free cultures* - Arch. f. Protist., Bd. 87, p. 123.

HALL R. P. e LOEFER J. B. 1936 — *On the supposed utilisation of inorganic nitrogen by the colorless Cryptomonad flagellate Chilomonas paramoecium* - Protoplasma, Vol. 26, p. 322.

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 T. L. 1930 — *Studies on the physiology of the Euglenoid flagellates* - P. II. Biol. Bull., Vol. 58, p. 281.

JAHN T. L. 1931 — *Studies on the physiology of the Euglenoid flagellates* - P. III, Biol. Bull., Vol. 61, p. 287.

JAHN T. L. 1935 — *Studies on the physiology of the Euglenoid flagellates P. V.* - Arch. f. Protist., Bd. 86, p. 238.

JAHN L. T. 1932 — *The effects of temperature and certain organic acid radicals on Euglena gracilis* - Collect. Net. Woods Hole, Vol. 7, p. 269.

JACOBSEN 1910 — *Kulturversuche mit einigen niederen Volvocalen* - Zeits. f. Botan. - Bd. 2, p. 145.

JOHNSON D. F. 1935 — *Isolation of Glaucocystis ficaria in bacteria-free cultures and growth in relation to pH of the medium* - Arch. f. Protist. Bd. 86, p. 263.

JOHNSON D. F. 1936 — *Growth of Glaucocystis ficaria in cultures with single species of other microorganisms* - Archiv. f. Protist. Bd. 86, p. 359.

KARSTRÖM H. 1930 — *Ueber die Enzymbildung in Bakterien und über einige physiologische Eigenschaften der untersuchten Bakterienarten* - Tesi-Helsingfors.

KNIGHT B. C. J. G. 1936 — *Bacterial nutrition.* - Medical Research Council Spec. Rep. Ser., N. 210.

KOSTYTSCHEW S. 1926 — *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie* - Berlin, Springer 1926.

KOSTYTSCHEW S. e RYSKALTSCHUK C. 1925 — *Les produits de fixation de l'azote atmosphérique par l'Azotobacter agile* - C. R. Ac. Sciences., Vol. 180, p. 2070.

- KOSTYTSCHEW S. e TSWETKOWA E. 1926 — *Ueber die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze* - *Zeit. f. physiol. Chem.*, Bd. 111, p. 171.
- 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, p. 103.
- LOEFER J. B. 1934 — *The trophic nature of Chlorogonium and Chilomonas* - *Biol. Bull.*, Vol. 66.
- LOEFER J. B. 1935 — *Effects of certain carbohydrates and organic acids on growth of Chlorogonium and Chilomonas* - *Arch. f. Protist.*, Bd. 84, p. 456.
- LOEFER J. B. 1935 — *Effect of certain nitrogen compounds on the growth of Chlorogonium and Chilomonas* - *Archiv. f. Protist.*, Vol. 85, p. 74.
- LOEFER J. B. 1935 — *Relation of hydrogen-ion concentration to growth of Chilomonas and Chlorogonium* - *Arch. f. Protist.* Bd. 85, p. 210.
- LOEFER J. B. 1936 — *Effect of certain « peptone » media and carbohydrates on the growth of Paramecium bursaria* - *Arch. f. Protist.* Bd. 87, p. 142.
- LOEFER J. B. 1936 — *A simple method for maintaining pure-line mass cultures of Paramecium caudatum* - *Trans Amer. Micr. Soc.*, Vol. 55, p. 255.
- LOEFER J. B. 1936 — *Bacteria-free culture of Paramecium bursaria and concentration of the medium as a factor in growth.* - *J. Expr. Zool.*, Vol. 72, pg. 387.
- 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 fèr, 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 et les 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 parahémotrophe* - 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. 1938 — *Remarques sur la physiologie comparée des Protistes Eucaryotes. Les Léucophytes et l'oxytrophie*. - Arch. f. Protist., Bd. 90, p. 194.
- LWOFF A. e DUSI H. 1929 — *Le pouvoir de synthèse d'Euglena gracilis cultivée à l'obscurité* - C. R. Soc. Biol., T. 102, p. 567.
- LWOFF A. e 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. e DUSI H. 1934 — *L'oxytrophie et la nutrition des flagellés leucophytes* - Ann. Instit. Pasteur, T. 53, p. 641.
- LWOFF A. e DUSI H. 1935 — *La suppression expérimentale des chloroplastes chez Euglena Mesnili* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 1092.
- LWOFF A. e DUSI H. 1935 — *La nutrition azotée et carbonnée de Chlorogonium euthorum à l'obscurité; l'acide acétique envisagé comme produit de l'assimilation chlorophyllienne*. - C. R. Soc. Biol. T. 119, p. 1260.
- LWOFF A. e DUSI H. 1936 — *La nutrition de l'Euglénien Astasia Chattoni* - C. R. Acad. des Sciences, T. 202, p. 248.
- LWOFF A. e DUSI H. 1937 — *Le thiazol, facteur de croissance pour les flagellés Polytoma caudatum et Chilomonas paramoecium* - C. R. Ac. Scienc., T. 205, p. 756.
- LWOFF A. e DUSI H. 1937 — *Le thiazol, facteur de croissance pour le flagellé Polytoma ocellatum*. C. R. Ac. Scienc., T. 205, p. 882.
- LWOFF A. e DUSI H. 1937 — *Le pyrimidine et le thiazol, facteurs de croissance pour le flagellé Polytomella coeca*. - C. R. Ac. Scienc., T. 205, p. 630.
- LWOFF A. e DUSI H. 1938 — *Culture de divers flagellés Leucophytes en milieu synthétique*. - C. R. Soc. Biol., T. 127, p. 53.
- LWOFF A. e DUSI H. 1938 — *L'activité de diverses pyrimidines considérées comme facteurs de croissance pour les flagellés Polytomella coeca et Chilomonas paramoecium* - C. R. Soc. Biol. T. 127, p. 1408.
- LWOFF A. e DUSI H. 1938 — *Influence de diverses substitutions sur l'activité du thiazol considéré comme facteur de croissance pour quelques flagellés Léucophytes*. - C. R. Soc. Biol., Vol. 128, p. 238.
- LWOFF A. e 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. e LWOFF M. 1929 — *Le pouvoir de synthèse de Chlamydomonas agloëformis et d'Haematococcus pluvialis en culture pure à l'obscurité* - C. R. Soc. Biol., T. 102, p. 569.
- LWOFF A. e 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. e LWOFF M. 1936 — *Sur la nature du facteur V*. - C. R. Ac. Sciences, T. 203, p. 520.
- LWOFF A. e LWOFF M. 1937 — *L'onéurine facteur de croissance pour Glaucoma pyriformis* - C. R. Soc. Biol., Vol. 126, p. 644.
- LWOFF A. e LWOFF M. 1938 — *La spécificité de l'anéurine facteur de croissance pour le cilié Glaucoma pyriformis*. - C. R. Soc. Biol., T. 127, p. 1170.
- LWOFF A. e 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 A. e PROVASOLI L. — *Caractères physiologiques du flagellé Polytoma obtusum* - C. R. Soc. Biol., T. 126, p. 278.
- 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 paramétrophes. 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.
- LWOFF M. 1938 — *L'anéurine facteur de croissance pour les Strigomonas (Flagellés Trypanosomides).* - C. R. Soc. Biol., Vol. 128, p. 241.
- LWOFF M. 1937 — *L'anéurine facteur de croissance pour le flagellé trypanosomide Strigomonas oncopelti* - C. R. Soc. Biol., Vol. 126, p. 771.
- 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 protoplasm in the colorless animals, Chilomonas paramoecium* - Protoplasma, Vol. 20, p. 326.
- OGATA M. 1893 — *Ueber die Reinkultur gewisser Protozoen* - Zentr. f. Bakt. Bd. 14, p. 165.
- OEHLER R. 1916 — *Amoebenzucht auf reinen 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. 1914-1927 — *Die Süßwasserflora Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz* - G. Fischer, Jena.
- PASCHER A. 1916 — *Zur Auffassung der farblosen Flagellatenreihen* - Ber. Deut. Bot. Ges., Bd. 34, p. 440.
- PASCHER A. 1916 — *Studien über die rhizopodiäre Entwicklung der Flagellaten* - Arch. f. Protist., B. 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. 1918 — *Amoeboiden Stadien bei einer Protozoenform, nebst Bemerkungen über den primitiven Charakter nicht festsitzender Algenformen.* - Ber. Deuts. Bot. Gesel., Bd. 36, p. 253
- PASCHER A. 1918 — *Von einer allen Algenreihen gemeinsamen Entwicklungsregel.* - Ber. Deuts. Bot. Gesel., Bd. 36, p. 390.
- PASCHER A. 1918 — *Ueber amoeboiden Gameten, Amoebozygoten und diploide Plasmodien bei einer Chlamydomonadine.* - Ber. Deuts. Bot. Gesel., Bd. 36, p. 352.

- PASCHER A. 1924 — *Ueber die morphologische Entwicklung der Flagellaten zu Algen*. - Berich. der Deutsch. Bot. Gesel., Bd. 42, p. 148.
- PASCHER A. 1930 — *Eine neue stigmatisierte und phototaktische Amoebe* - Biol. Zentr., Bd. 50, p. 1.
- PASCHER A. 1931 — *Ueber eine farblose einzellige Volvocale und die farblosen und grünen Parallelförmigen der Volvocales*. - Beih. z. Bot. Centr., Bd. 48, Abt. I, p. 481.
- PRINGSHEIM E. G. 1912 — *Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen: I Parte: Die Kultur von Algen in Agar*. - Beitr. z. Biol., Pflanz., Bd. 11, p. 305.
- 1914 — II Parte: *Zur Physiologie der Euglena gracilis*. - Ebenda, Bd. 12, p. 1.
- 1914 — IV Parte: *Die Ernährung von Haematococcus pluvialis*. - Ebenda, Bd. 12, p. 443.
- 1926 — V Parte: *Methoden und Erfahrungen*. - Beitr. z. Biol. Pflanz., Bd. 14, p. 283.
- PRINGSHEIM E. G. 1920 — *Zur Physiologie von Polytoma uvella*. - Ber. Detsch. bot. Ges. Bd. 38, p. 8.
- PRINGSHEIM E. G. 1921 — *Zur Physiologie saprophytischen Flagellaten (Polytoma, Astasia und Chilomonas)* - Beitr. z. Allg. Botanik, Bd. 2, p. 88.
- PRINGSHEIM E. G. und MAINX F. 1926 — *Untersuchungen an Polytoma uvella Ehr. insbesondere über Beziehungen zwischen chemotaktischen Reizwirkung und chemischer Konstitution* - Planta Arch. f. wiss. Bot. Bd. 1, p. 583.
- PRINGSHEIM E. G. 1932 — *Saprophyten. Handwörterbuch der Naturwissenschaften, 2 Aufl.* - Bd. 8, Jena.
- PRINGSHEIM E. G. 1934 — *Ueber die pH Grenzen einiger saprophytischer Flagellaten*. - Naturwiss. Bd. 22, p. 510.
- PRINGSHEIM E. G. 1934 — *Ueber 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. 1935 — *Ueber Azetatflagellaten*. Naturwiss. Bd. 23, p. 110.
- PRINGSHEIM E. G. 1936 — *Das Rätsel der Erdabkochung* - Bot. Centr., Bd. 55, p. 100.
- PRINGSHEIM E. G. 1936 — *Zur Kenntnis saprotropher Algen und Flagellaten:*
- 1<sup>o</sup> Mitteilung: *Ueber Anhäufungen Kulturen polysaprober Flagellaten* - Arch. f. Protist. Bd. 87 pg. 43.
- 1937 — II<sup>o</sup> Mitteilung: *Ueber eine neue, farblose Polyblepharidine, Polytomella coeca* - Arch. f. Protist. Bd. 88 pg. 150.
- PRINGSHEIM E. G. 1937 — *Ueber das Stigma bei farblosen Flagellaten* - Cytologia, Fujii Festschrift. Tokyo.
- PRINGSHEIM E. G. 1937 — *Beiträge zur Physiologie saprotropher Algen und Flagellaten:*
- I Parte: *Chlorogonium und Hyalogonium* - Planta. Arch. wiss. Bot. Bd. 26 pg. 631.
- II Parte: *Polytoma und Polytomella* - Planta. Arch. wiss. Bot. Bd. 26 pg. 665.
- III Parte: *Die Stellung der Azetatflagellaten in einen physiologischen Ernährungssystem*. Planta. Arch. wiss. Bot. Bd. 27 pg. 61.
- PRINGSHEIM E. G. 1937 — *Assimilation of different organic substances by Saprophytic Flagellatae*. Nature Vol. 139 pg. 196.
- PROVASOLI L. 1935 — *La culture pure mixte du cilié hypotriche Kahlia acrobates* - C. R. Soc. Biol., T. 119, p. 93.
- PROVASOLI L. 1937 — *Stato attuale delle ricerche sulla nutrizione dei Protozoi* - Boll. Lab. Zool. Agr. Vol. VII<sup>o</sup>.
- PROVASOLI L. 1937 — *La nutrition carbonée du flagellé Polytoma uvella* - C. R. Soc. Biol. T. 126 pg. 280.

- PROVASOLI L. 1937 — *La nutrition carbonée du flagellé Polytoma ocellatum* - C. R. Soc. Biol., T. 126 pg. 847.
- PROVASOLI L. 1938 — *Remarques sur la nutrition carbonée des Eugléniens* - C. R. Soc. Biol. T. 127 pg. 190.
- PROVASOLI L. 1938 — *La nutrition carbonée de l'Euglénien Astasia quartana* - C. R. Soc. Biol. T. 127 pg. 51.
- PROVASOLI 1938 — *La nutrition carbonée de Chilomonas paramoecium* - C. R. Soc. Biol. Vol. 128.
- PROVASOLI L. 1938 — *La nutrition carbonée de Polytomella coeca* - C. R. Soc. Biol. Vol. 128.
- PROVASOLI L. 1938 — *Utilisation par certains leucophytes des acides gras supérieurs et des alcools* - C. R. Soc. Biol. Vol. 128.
- PROVASOLI L. 1938 — *Sur l'existence d'enzymes adaptatifs chez les flagellés leucophytes* - C. R. Soc. Biol. Vol. 128.
- REICHENOW E. 1929 — *Lehrbuch der Protozoenkunde* - G. Fischer. Jena.
- ROTTIER P. B. 1936 — *Recherches sur les courbes de croissance de Polytoma uvella. L'influence de l'oxygénation* - C. R. Soc. Biol. T. 122 pg. 65.
- ROTTIER P. B. 1936 — *Recherches sur la croissance de Polytoma uvella. L'influence de la concentration des substances nutritives* - C. R. Soc. Biol. T. 122 pg. 776.
- SANDON H. 1932 — *The Food of Protozoa* - Egyptian Univ. Publ. Fac. Sci., 1, Cairo.
- SCHERFFEL A. 1911 — *Beitrag zur Kenntnis der Chrysomonadinen* - I<sup>o</sup> Arch. fr. Prot. Bd. 22 pg. 301.
- SCHERFFEL A. 1927 — *Beitrag zur Kenntnis der Chrysomonadinen II<sup>o</sup>* - Arch. f. Prot. Bd. 57 pg. 331.
- SCHOFFER e W. RYTZ 1937 — Arch. f. Mikrobiol. Bd. 8 pg. 244.
- TERNETZ C. 1912 — *Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis* - Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 51, p. 435-514.
- ULLRICH H. 1924 — *Die Rolle der Chloroplasten in der Eiweißbildung in den grünen Pflanzen*. - Zeit. f. Botan. Bd. 16 pg. 513.
- 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 — *Bakterienfreie Züchtung von Thrichomonaden aus dem Uterus des Rindes in einfachen Nährboden* - Centr. f. Bakt., Bd. 128, pg. 188.
- YUDKIN J. 1932 — Biochem. Jour. Vol. 26 pg. 1859.
- ZOTTA G. 1923 — *Observations sur la biologie du Leptomonas pyrrocoris dans divers milieux de culture* - Ann. Scient. Univ. de Jassy, Vol. 12, pg. 35.
- ZUMMSTEIN H. 1899 — *Zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis* - Thèse - Leipzig - Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 34, p. 174.