

Ricerche sperimentali  
sulla vulnerabilità del *Nosema bombycis* Naeg.  
e dell'embrione del filugello al calore

PREMESSA

Il presente lavoro è stato intrapreso per chiarire alcuni quesiti riguardanti il comportamento delle uova del Baco da seta e del suo più importante parassita, il *Nosema bombycis* Naeg., di fronte ad importanti agenti esterni quali il calore e l'umidità. Non ha certo la pretesa di stabilire se sia possibile, mediante il calore, eliminare nella pratica industriale della confezione del « seme-bachi » il protozoo responsabile della pebrina, per ottenere partite di seme sicuramente esenti da tale morbo, senza ricorrere al comune e dispendioso sistema dell'analisi microscopica del pesto delle farfalle madri. Non neghiamo tuttavia che, durante la presente ricerca, ci siamo talvolta soffermati di fronte al miraggio di una possibilità di disinfezione pratica e rapida del « seme-bachi » dal *Nosema* mediante il calore. In proposito devesi ricordare che sono stati suggeriti allo stesso scopo altri espedienti tra cui, ingegnoso, quello basato sulla separazione delle uova sane da quelle infette da pebrina, mediante vapori di mercurio in base alla suscettibilità delle uova infette (MASERA), ma anche questo sistema si è dimostrato inapplicabile nella grande pratica.

L'idea di considerare la vulnerabilità del *Nosema bombycis* al calore ci è stata suggerita da un esperimento condotto pochi anni fa da due ricercatori americani: ALLEN e BRUNSON. Essi misero delle uova di *Phthorimaea operculella* Zell., deposte da femmine infette da un microsporidio del genere *Nosema*, in un tubo metallico ed immersero questo tubo in acqua a  $+ 47^{\circ}$  C. per 20', cercando di



disinfettare le uova, cioè di uccidere il protozoo senza danneggiare le uova stesse. Il risultato fu, secondo i due suddetti autori, positivo; riduzione del 75-90% dell'infezione nelle partite di uova trattate. Il risultato è stato, in linea generale, confermato da altri AA. e precisamente FINNEY, FLANDES e SCHMIDT.

Abbiamo quindi ritenuto interessante sperimentare se il metodo suddetto potesse dimostrarsi efficace sulle uova di *Bombyx mori* L. infette da pebrina, anche a prescindere da un'applicazione pratica all'industria. Abbiamo perciò istituito numerose prove tendenti essenzialmente a determinare:

a) in quale stadio di sviluppo embrionale le uova sane presentassero maggiore resistenza al calore;

b) in quale stadio di sviluppo embrionale delle uova pebrinose il parassita si presentasse più vulnerabile al calore stesso. Da tali prove era lecito attendersi risultati che indicassero se esistesse una via per ottenere una eliminazione od almeno una riduzione dell'infezione nelle uova pebrinose, senza ledere la vitalità delle uova e il buon successo dell'allevamento che ne deriva; e che in caso positivo permettessero di precisare il metodo da seguire.

Tutte queste prove furono effettuate in parte in periodi di tempo diversi ed in certi casi sfruttando anche lo schiudimento estemporaneo mediante acido cloridrico, ed in parte contemporaneamente, ma sempre isolatamente, cioè in ambienti separati e con precauzioni tali da non compromettere il risultato finale.

---

La presente pubblicazione è tratta dalla Tesi di Laurea in Scienze Biologiche di Renato Craveri, effettuata presso l'Istituto di Entomologia Agraria e Bachicoltura dell'Università di Milano. Il lavoro è stato premiato al concorso bandito dall'Ente Nazionale Serico per la migliore tesi di Laurea in materia di Sericoltura per l'anno Accademico 1950-51. Ma poiché il lavoro fu condotto con la costante e piena collaborazione del Dott. Pierantonio Rota, assistente dell'Istituto, esso vede la luce coi nomi dei due collaboratori, col pieno consenso di questi e del Prof. Remo Grandori, Direttore dell'Istituto.

## PARTE PRIMA

### *La resistenza al calore da parte del seme-bachi*

Scopo di questo lavoro è stato anzitutto la ricerca della massima temperatura alla quale possono resistere senza danno la uova del Filugello, anche in rapporto all'andamento dell'allevamento e alle caratteristiche del raccolto dei bozzoli.

Riguardo a questa resistenza al calore, è stata presa in considerazione, oltre alla durata del trattamento, anche l'umidità ambiente. Inoltre si è cercato di stabilire se un diverso grado di resistenza fosse in relazione allo stadio di sviluppo delle uova, cioè a diversi tempi trascorsi dopo la deposizione.

Sono state adoperate tre modalità di erogazione del calore:

- 1) Introducendo le uova in apposito tubo metallico contenente aria, chiuso da coperchio, e mantenendo il tubo immerso nell'acqua riscaldata di un bagnomaria;
- 2) Introducendo le uova in termostato ad umidità regolabile;
- 3) Sottoponendo le uova a una fonte di raggi infrarossi.

Riguardo al periodo trascorso dalla deposizione, le prove sono state effettuate:

- a) In periodo di ibernazione avanzata (stria germinale in piena diapausa);
- b) entro 36 ore dalla deposizione (stria germinale appena completata);
- c) dopo una settimana dalla deposizione, cioè all'inizio della diapausa.

L'influenza del calore e dell'umidità (fattori strettamente collegati fra loro) può manifestarsi con un effetto puramente meccanico (azione sul corion) e con un effetto fisiologico; generalmente con entrambi gli effetti, specialmente superando un certo limite di temperatura. Sappiamo che il più importante fattore fisico influenzante lo sviluppo e la schiusura dell'uovo degli insetti è proprio la tempe-

ratura con il concorso dell'umidità. Entro i limiti vitali caratteristici di ogni specie, lo sviluppo è rallentato o accelerato dal calore: al disotto di una data temperatura (zero critico per ogni singola specie) l'uovo non si sviluppa, ma può riprendere lo sviluppo se la temperatura non è stata troppo inferiore a questo zero critico rialzando la temperatura stessa fino a quella ottimale. Per le alte temperature l'effetto accelerante si arresta ad un dato grado, per diventare invece irreversibilmente letale sorpassando questa soglia, cioè lo sviluppo dell'uovo non è più ripreso riportandolo a temperature più basse. Ciò si è constatato anche nelle uova del baco da seta, che sono state sottoposte a temperature fino a  $+ 55^{\circ}$  C.

Per la resistenza del seme bachi al calore, dalla letteratura si possono trarre ben scarsi dati. Sappiamo dalla pratica secolare che la temperatura ottimale alla fine dell'incubazione del seme bachi è di circa  $+ 23^{\circ}$  C.; che nel trattamento delle uova appena deposte con una soluzione di HCl per la schiusura estemporanea, bisogna attendere che la temperatura della soluzione, determinata dalla reazione esotermica tra l'acido e l'acqua (inizialmente circa  $+ 50^{\circ}$  C.) sia scesa a circa  $+ 30^{\circ}$  C.

Qualche A. cita vagamente per il seme-bachi la temperatura di oltre  $+ 30^{\circ}$  C. come letale nel senso di incidente dannosamente sul raccolto dei bozzoli. Però in certe località si ricordano degli anni in cui si ebbero prima della stessa schiusura delle uova temperature di oltre  $+ 30^{\circ}$  C., senza che la cosa si dimostrasse letale per le nascite di bacoletti. A Chieti nell'estate del 1923 si ebbe una temperatura che per alcuni giorni si avvicinò ai  $+ 40^{\circ}$  C. senza alcun danno agli allevamenti (osservazioni del Prof. GRANDORI).

Per ciò che concerne l'azione dei raggi infrarossi sul seme-bachi, nulla è stato reperito nella letteratura.

Prendendo in considerazione le tre fasi di sviluppo delle uova su cui abbiamo sperimentato, in relazione alla resistenza al calore, i nostri risultati dimostrerebbero anzitutto che, in generale, il seme-bachi presenta maggior resistenza in periodo di diapausa che non nel primo periodo dalla deposizione. Questo reputiamo sia determinato dal fatto che l'uovo del *Bombyx mori* nelle prime ore di vita è più sensibile e vulnerabile agli agenti esterni, essendo in piena attività di proliferazione cellulare. Stimoli perturbatori su questa delicata attività della segmentazione compromettono l'esito dello sviluppo defi-

nitivo e inducono nell'embrione anomalie che possono arrivare in caso estremi ad anomalie morfologiche e fisiologiche non correggibili dai normali fattori compensatori, e perciò letali. Nel periodo di diapausa invece, l'embrione è in riposo, la sua attività morfogenetica è sospesa e l'attività vitale è ridotta ad uno stadio di vita minima, cosicchè è spiegabile che agendo su di esso in questa fase esso non risenta danno. Inoltre l'azione degli agenti esterni incontrerà in diapausa una maggior resistenza per opera degli involucri embrionali sottostanti il corion, che durante la diapausa sono completamente formati, mentre sono in via di formazione nelle prime ore della segmentazione.

Tutto ciò naturalmente vale per stimolazione da calore fino ad una data temperatura, al di là della quale l'effetto fisiologico del calore è mortale, essendo le difese naturali dell'uovo insufficienti oltre quel limite.

#### Modalità e tecnica degli esperimenti

Nella nostra ricerca abbiamo impiegato, come già è stato detto, tre differenti tecniche: 2 consistenti in somministrazione di calore, ed una in somministrazione di calore ed umidità. Siamo stati portati a considerare la somministrazione di umidità dal fatto che durante l'incubazione delle uova deve essere sempre mantenuto un certo grado di umidità nell'ambiente, se si vogliono ottenere buoni risultati di nascite e di raccolto di bozzoli. La pratica empirica tanto deprecata, un tempo diffusa in certi luoghi, di fare incubare il seme-bachi sul seno delle donne ( $+ 37^{\circ}$  C., temperatura che, protratta per parecchi giorni, dovrebbe essere gravemente nociva alle uova del Filugello) conduceva ad un residuo di uova non schiuse piuttosto basso; verosimilmente, in tali condizioni, un altro fattore agiva come compensatore e correttivo della dannosa azione prolungata del calore, e cioè la traspirazione del corpo umano, con produzione di elevato grado di umidità nello strato d'aria fra gli indumenti e la cute.

*Primo metodo di erogazione di calore: tubo a bagno-maria.*

Un tubo cilindrico di ottone di circa 15 cm. di lunghezza e 4 cm. di diametro, con coperchio a vite a tenuta d'acqua, veniva immerso per tempi e temperature diverse a bagno-maria, dopo avervi intro-

dotto una determinata quantità di seme-bachi. La temperatura era controllata con un termometro immerso nel bagno-maria. La temperatura si manteneva costante regolando la fiamma del Becco Bunsen sotto il bagno-maria.

Con questo metodo si ottenevano oscillazioni da 0,1° a 0,5° C.: il tubo non poggiava sul fondo del recipiente ma era sospeso nell'acqua in posizione orizzontale ed il bulbo del termometro si trovava allo stesso livello.

*Secondo metodo di erogazione di calore: termo-igrostatico.*

Questo sistema, che ci ha portato alle constatazioni più precise ed interessanti, consisteva in una piccola camera termoigrostatica ricava apportando opportune modifiche ad un termostato: si è potuto così regolare temperature ed umidità controllandole e regolandole costantemente a piacere. Le uova nel termo-igrostatico poggiavano in strato unico su di un piatto di vetro leggermente concavo.

*Terzo metodo di erogazione di calore: raggi infrarossi.*

Questo terzo sistema consiste sostanzialmente nell'impiego di radiazioni infrarosse come fonte di calore. La radiazione emessa dalla sorgente che abbiamo usato, hanno un massimo di intensità verso i 13.000  $\lambda$ . Questa lunghezza d'onda è quella cui corrisponde, secondo le varie esperienze eseguite sulle più diverse sostanze, il massimo rendimento calorifico, essendo tale radiazione la più assorbita dalle sostanze. Abbiamo adoperato nelle nostre prove come sorgente un radiatore Philips da 250 Watt. Tale radiatore è stato installato entro un piccolo castello di legno, avente per fondo una grossa lastra di vetro. Il radiatore risultava spostabile verticalmente per mezzo di una carrucola sopra il castello. Dato che l'intensità delle radiazioni diminuisce col quadrato della distanza, la distanza di questa sorgente di raggi infrarossi sul materiale deve essere molto ridotta; l'altezza da noi tenuta è stata di cm. 20. Il seme-bachi anche qui poggiava in strato unico su un piatto di vetro leggermente concavo. L'azione dei raggi infrarossi sulle uova da noi trattate non può certo essere stata un'azione puramente termica. Pensiamo che abbia avuto peso sulla resistenza e mortalità del seme-bachi, oltre all'effetto termico, anche quello chimico. Il che è avvalorato dal fatto che per uguale tempo di

trattamento, è alquanto diversa la resistenza al solo calore (tubo a bagno-maria e termo-igrostatico) in confronto alla resistenza ai raggi infrarossi.

La temperatura in questo terzo sistema di erogazione di calore, veniva controllata con un termometro fissato sulla lastra di vetro di fondo, il cui bulbo si trovava al centro della zona d'azione dei raggi. Per ogni prova si è atteso il raffreddamento della lampada e del termometro.

*TRATTAMENTO SU UOVA SANE (RAZZA ORO-CINESE)  
IN AVANZATA DIAPAUSA (MARZO) E ALLEVAMENTO DEI BACHI*

Le uova sono state tolte dal frigorifero nei giorni compresi fra il 7 e il 13 marzo. Appena prelevate dal frigorifero la cui temperatura si aggirava attorno a + 2° C., esse subivano subito il trattamento, per essere poi immediatamente riportate in frigorifero alla medesima temperatura. Dopodichè esse subivano il trattamento della normale consuetudine bacologica. Lo stesso dicasi riguardo all'allevamento dei bachi.

*Primo gruppo di esperimenti*

Metodo di erogazione di calore: tubo a bagno-maria. Variano la temperatura e la durata del tempo di erogazione. Umidità ambiente esterno 65%. In ciascuna prova si è partiti da un lotto di 200 uova.

Tabella delle percentuali delle nascite e delle percentuali dei bozzoli ottenuti

T°	18°		20°		22°		24°	
	%	%	%	%	%	%	%	
	Nascite	Bozzoli	Nascite	Bozzoli	Nascite	Bozzoli	Nascite	Bozzoli
43°	95	94	94	93	94	90	92	91
45°	92	90	90	86	88	87	86	80
47°	87	85	86	84	83	80	81	78
49°	73	65	70	66	67	68	62	57
51°	38	31	36	30	30	26	19	15
53°	7	5	2	2	0	0	0	0

Lotto di controllo: Nascite 96%; Bozzoli 94%.

- N. B. 1) Le fallanze alla schiusura sono deducibili dalle relative percentuali delle nascite;
- 2) le percentuali bozzoli sono calcolate in riferimento alla totalità delle uova di partenza e non alla percentuale di nascite;
- 3) dato che il calcolo delle percentuali è stato fatto su lotti di partenza di 200 elementi, si è apportata, ogni qualvolta occorre, la correzione per eccesso. Ciò vale anche per gli esperimenti successivi.

Si deve notare anzitutto come lo sbalzo più forte delle percentuali di nascite si abbia tra i lotti trattati a + 49° C. e + 51° C. Altra importante constatazione: mentre il lotto di controllo ha iniziato le nascite il 30 Aprile (l'incubazione si è iniziata per tutti i lotti l'11 aprile), i lotti trattati fino a + 47° C. hanno iniziato le nascite prima del controllo medesimo; al contrario invece, i lotti che hanno subito temperatura superiore ai + 47° C., diedero nascite ritardate rispetto al controllo. Sembra dunque che fino a + 47° C. vi sia accelerazione dello sviluppo embrionale senza danno, e più oltre vi sia menomazione di vitalità. In tutti i casi la durata del periodo di allevamento (dalle nascite alla salita al bosco) è stata abbastanza regolare: 30-32 giorni. Il tempo intercorso fra l'inizio della salita al bosco e la fine della tessitura è stato per tutti i lotti indistintamente di 2-3 giorni.

### Secondo gruppo di esperimenti

Metodo di erogazione di calore: termo-igrostatico. Variano le temperature e le percentuali di umidità relativa. Si è mantenuta costante la durata del tempo del trattamento (20'). In ciascuna prova si è partiti da un lotto di 200 uova.

Tabella delle percentuali delle nascite e delle percentuali dei bozzoli ottenuti

Umidità	60%		75%		90%	
	T°	% Nascite	% Bozzoli	% Nascite	% Bozzoli	% Nascite
43°	95	92	95	93	96	93
45°	92	90	92	90	94	93
47°	89	87	92	87	92	90
49°	85	76	87	79	90	88
51°	63	60	71	68	78	76
53°	22	18	31	26	29	28

Lotto di Controllo: Nascite 96%; Bozzoli 94%.

N. B. - Vedi N. B. del primo gruppo di esperimenti.

Si osservi che le differenze più forti delle percentuali di nascite si hanno qui tra i lotti trattati a + 49° C. e + 51° C. e tra + 51° C. e + 53° C. I lotti trattati a temperature fino a + 47° C. e quelli a + 49° C. e umidità relativa del 75% e 90% ebbero nascite precoci rispetto al controllo. Il lotto trattato a + 49° C. e umidità relativa 60% presentò nascite normali. Nei lotti trattati a temperature superiori si osservarono invece ritardi di nascite anche notevoli, rispetto al controllo. Durata del periodo di allevamento, regolare per tutti i lotti. Il tempo intercorso tra l'inizio della salita al bosco e la fine della tessitura dei bozzoli è stato per tutti i lotti indistintamente della durata di due-tre giorni.

### Terzo gruppo di esperimenti

Metodo di erogazione di calore: raggi infra-rossi. Variano i tempi di erogazione ed al termine di ciascun tempo di erogazione corrisponde una temperatura finale. Si intende dire con questo che la temperatura durante ciascuna prova non è costante, ma crescente fino ad un massimo corrispondente appunto alla temperatura finale che è stata segnata nella tabella seguente. Il trattamento in tutte le prove è avvenuto in ambiente aperto alle seguenti condizioni: umidità relativa di partenza 65%, temperatura ambiente + 20° C., distanza delle uova dal radiatore 20 cm.. L'inizio del tempo di erogazione corrisponde all'innesto della corrente. Anche in questi esperimenti si è partiti sempre da 200 uova per ciascun lotto.

Tabella delle percentuali delle nascite e delle percentuali dei bozzoli ottenuti

Tempi di erogazione.	30"	1'	1'30"	2'	2'30"	3'	3'30"	4'	4'30"	5'	5'30"	6'
Temperat. finale corrisp.	29°	33°	36,3	38°	41°	43°	44,8	46°	47,5	48°	49°	50°
% nascite	96	98	96	87	68	49	30	12	5	1	—	—
% bozzoli	94	97	95	78	59	42	24	8	3	1	—	—

Lotto di controllo: Nascite 96%; Bozzoli 94%.

Come si vede dalla tabella, al di sopra di un minuto e trenta secondi di erogazione (tempo al quale corrisponde una temperatura raggiunta di + 36° C.) vi è una graduale rapida discesa della resistenza delle uova trattate, quindi delle percentuali di nascite e di bozzoli. Si può quindi dire, confrontando questi risultati con quelli delle precedenti tabelle, che la resistenza ai raggi infra-rossi è alquanto più bassa che non quella al semplice calore, a parità di temperature raggiunte. Ciò sta ad indicare che l'azione di questa sorgente radiante non è solo calorifica ma verosimilmente anche chimica. Circa il periodo di schiusura, esso non è regolare fino a 4' di erogazione, ma precoce rispetto al controllo; oltre i 4' regolare o quasi. Circa l'allevamento, nulla di normale se non il fatto di aver ottenuto parecchi bozzoli irregolari nella forma.

*Osservazioni al binoculare effettuate sui tre gruppi di uova nei primi giorni di incubazione.*

Con l'aumento della temperatura e rispettivamente del tempo di erogazione dell'irradiazione, le uova trattate presentano il corion sempre più deformato: si potrebbe parlare di schiacciamento e di depressioni sinuose sulle faccie appiattite dell'uovo. Grandi anomalie nell'aspetto si incominciano a notare nelle uova trattate a + 51° C. e rispettivamente con un tempo di erogazione di irradiazione infra-rossa di 4': le uova appaiono quindi sempre più depresse e addirittura trasparenti con il trattamento di raggi infra-rossi per tempi superiori a 4': sembra che il plasma embrionale si sia portato, in questi casi, nella parte periferica dell'uovo.

#### *Alcune caratteristiche della seta dei bozzoli dei tre gruppi di esperimenti*

Abbiamo creduto opportuno fare effettuare un controllo delle proprietà della seta dei bozzoli ottenuti dagli allevamenti di cui si è detto, vale a dire un controllo della lunghezza delle bave, del titolo e delle proprietà dinamometriche. Esso è stato effettuato presso la stazione sperimentale della seta di Milano per cortese interessamento del Prof. Colombo al quale è doveroso esprimere il più vivo ringraziamento. I controlli condotti hanno dimostrato che le caratteristiche

in proposito non presentano alcuna notevole anomalia in rapporto a quelle normali presentate da seme bachi non trattato. Circa la lunghezza della bava dipanabile, ad esempio, si è ottenuto in tutti i casi la seguente media (ricordiamo trattarsi di razza oro-chinese):

Lunghezza della bava dipanabile . . .	m. 580
con estremi { da . . . . .	» 380
{ a . . . . .	» 760
Titolo medio della bava serica: denari 2,85	

#### *TRATTAMENTI SU UOVA SANE (RAZZA ORO CHINESE) ENTRO 36 ORE E 7 GIORNI DALLA DEPOSIZIONE*

Dei bozzoli ottenuti con il 1', 3' e 3' gruppo di esperimenti, una parte è stata lasciata sfarfallare. Si sono fatti accoppiare alcuni maschi con altrettante femmine sotto gli appositi conetti di accoppiamento: si sono potute avere in tal modo nuove partite di uova sane.

Benchè le farfalle provenissero da seme originariamente sano, abbiamo compiuto l'esame microscopico delle femmine che furono lasciate deporre le uova in cellette separate. Ciò per eliminare ogni possibilità di infezione sopravvenuta nel corso degli allevamenti. A tale esame tutte le farfalle risultarono sane.

Su queste uova sane si è iniziata il 17 giugno la seconda parte dei nostri esperimenti, per determinare la resistenza al calore delle uova del Filugello trattate entro 36 ore e dopo una settimana dalla deposizione, al fine di mettere in evidenza eventuali differenze tra questa resistenza e quella presentata nelle prove precedenti trattando uova in avanzata d'apausa.

Se per studiare gli effetti della sola somministrazione di calore su uova di poche ore o di pochi giorni di età, avessimo voluto usare uova alle quali nessun altro trattamento fosse applicato tranne la somministrazione del calore, avremmo dovuto attendere la primavera successiva per poter controllare le nascite, dato che la razza da noi adoperata era monovoltina. Siamo ricorsi perciò allo schiudimento estemporaneo mediante l'acido cloridrico (bivoltinismo artificiale) mediante il quale si sono ottenute le nascite pochi giorni dopo la deposizione.

Tali uova vennero divise in 2 lotti: il primo lotto subì il trattamento al calore il giorno immediatamente successivo al trattamento con HCl, il secondo lotto una settimana dopo la deposizione.

Ci si potrebbe chiedere se l'azione dell'HCl, seguita nel giro di poche ore da quella del calore, abbia potuto interferire con quest'ultimo alterando il risultato. In linea di massima pensiamo di no, per le seguenti ragioni:

1) Si sa che lo schiudimento estemporaneo con HCl porta ad ottime percentuali di nascite molto vicine al 100% con ottimi raccolti di bozzoli, se l'allevamento viene compiuto con ogni cura;

2) Considerando che l'effetto, che possiamo chiamare chimico, dell'HCl è benefico nel senso che provoca lo schiudimento, e ricordando che a tale effetto era legata una temperatura di + 30° C. (temperatura, come ormai sappiamo, sopportabile dal seme-bachi per lungo tempo, senza danno, e considerando che il trattamento al calore è stato effettuato per 20' il giorno successivo o dopo 6-7 giorni dalla deposizione, la somma delle due azioni (HCl + trattamento termico) non può aver fatto deviare dalla reale resistenza al calore le uova trattate. Poichè anche sbalzi di temperatura, entro limitata intensità e durata, agiscono come stimoli allo schiudimento estemporaneo, pensiamo che i due stimoli avrebbero, se mai, dovuto sommarsi, convergendo allo stesso effetto. D'altra parte, se questa duplicità di azione avesse avuto effetti dannosi, essa avrebbe dovuto condurre ad un esito disastroso anche quando abbiamo aggiunto all'HCl un trattamento termico (termoigrostatato) di lieve entità, mentre invece è risultato che fino ad una certa temperatura le uova, nel primo stadio di sviluppo, presentano una certa resistenza, per quanto notevolmente inferiore a quella presentata dalle uova in diapausa.

Come metodo di erogazione di calore in tutto questo gruppo di esperimenti, abbiamo adottato quello effettuato col termo-igrostatato, dato che negli esperimenti precedenti i metodi del tubo a bagnomaria e dei raggi infrarossi hanno dimostrato un esito inferiore, anzitutto per il fatto di non presentare la possibilità di regolare l'umidità e compensare, almeno in parte, l'effetto del calore. Come tempo di erogazione è stato mantenuto costante quello di 20'.

### Quarto gruppo di esperimenti

Variano le temperature e le percentuali di umidità relativa. In ciascuna prova si è partiti da un lotto di 200 uova.

Tabella delle percentuali delle nascite delle uova trattate entro 36 ore

% Umidità T°	60%	75%	90%
43°	82%	88%	91%
45°	79%	84%	86%
47°	67%	71%	73%
49°	32%	40%	52%
51°	8%	14%	20%
53°	—	—	—

Controllo (uova trattate solo con HCl): nascite 90%.

Tabella delle percentuali delle nascite delle uova trattate dopo una settimana dalla deposizione.

% Umidità T°	60%	75%	75%
43°	87%	91%	90%
45°	70%	85%	87%
47°	76%	77%	80%
49°	37%	42%	44%
51°	18%	20%	29%
53°	—	—	3%

Controllo: vedi precedente tabella.

**OSSERVAZIONI.** - In entrambi i casi espressi dalle due tabelle precedenti si può notare che le percentuali di nascite delle uova trattate da + 47° C. in poi sono inferiori del 50 % del totale delle uova di partenza, anche ad alte umidità di trattamento. Circa la schiusura delle uova è risultato che il controllo è schiuso dopo 12 giorni dal trattamento con HCl, come avviene di regola nella schiusura estemporanea, e nel giro di 2 giorni la schiusura è stata totale. Tutte le uova trattate anche col calore sono invece schiuse indistintamente 1-2 giorni prima di quelle del controllo, e le nascite di ciascuna partita sono state complete in una sola giornata.

Le osservazioni al binoculare sulle uova trattate nei suddetti due periodi, dimostrano modificazioni un poco più accentuate di quelle osservate sulle uova trattate in diapausa.

Non abbiamo creduto necessario procedere all'allevamento dei baciolini nati da queste uova, dato che ci è apparso evidente come la maggiore resistenza del « seme-bachi » non si abbia in questi due stadi, bensì in periodi di molto avanzata diapausa, come risulta dai dati espressi nelle tabelle riportate, ed essendoci prefisso di studiare il grado di resistenza dell'uovo del *Bombyx mori* al calore, in rapporto allo stadio di sviluppo dell'uovo stesso.

PARTE SECONDA

*La vulnerabilità del Nosema bombycis al calore*

Nel complesso vari AA. (STEMPELL, PEZZINI, FOÀ) sono d'accordo nel riconoscere che l'evoluzione di sviluppo del *Nosema bombycis* nell'uovo di *Bombyx mori*, segue lo sviluppo embrionale, nel senso che il parassita, durante la diapausa, arresterebbe o rallenterebbe il suo ciclo di sviluppo, poichè per manifestare tutte le proprie attività vitali e riprodursi, esso ha probabilmente bisogno che anche l'ospite sia in piena attività.

Per il *Nosema bombycis* abbiamo distinto, nei nostri esperimenti, 3 periodi di sviluppo, parallelamente a 3 periodi di sviluppo dell'uovo ospite e precisamente:

- 1°) Le prime 36 ore dalla deposizione dell'uovo;
- 2°) Le ore immediatamente successive alla prima settimana dalla deposizione;
- 3°) La diapausa molto avanzata dell'uovo.

Considerando la sensibilità del *Nosema* all'azione del calore, e ricordando l'esperimento di ALLEN e BRUNSON, tendente a disinfettare le uova di *Photorimaea operculella*, ci siamo chiesti: esiste una differente resistenza al calore da parte del parassita in confronto a quella dell'ospite? E se esiste, in quale periodo di sviluppo embrionale si riscontra maggiormente tale differenza di resistenza al calore? Quale dei due è più resistente? Fino a quale limite? Problemi ardui e complessi che non abbiamo inteso certo risolvere radicalmente, ma che abbiamo cercato di inquadrare entro limiti meno vaghi di quanto permettano le attuali conoscenze sul ciclo del *Nosema* nell'uovo, insufficienti e talvolta contraddittorie. Abbiamo cercato insomma di recare un contributo alla conoscenza degli effetti di agenti fisici sul *Nosema* stesso, sui quali mancano finora notizie.



### Modalità e tecnica degli esperimenti

Per osservare la resistenza del Nosema nel seme-bachi e quindi la sua mortalità per azione del calore, abbiamo condotto prove adottando il seguente metodo:

a) Triturazione e centrifugazione di uova sicuramente pebrinose (razza Oro Chinese) appartenenti a tre gruppi corrispondenti ai tre periodi di sviluppo dell'uovo sopra accennati; abbiamo ottenuto così tre tipi di liquido pebrinoso che sono stati diluiti in liquido di Ringer;

b) Trattamento di questi liquidi pebrinosi a varie temperature per un tempo fisso di 20';

c) Somministrazione di tali liquidi a larve di Filugello sicuramente sane.

Tali operazioni sono state naturalmente condotte in epoche diverse; il trattamento termico del pesto pebrinoso da uova in diapausa avanzata è avvenuto in marzo, quello del pesto pebrinoso da uova di non oltre 36 ore e di circa una settimana è avvenuto in giugno, cioè quando è stato possibile avere nuove parite di seme-bachi depresso da farfalle pebrinose.

Le modalità seguite sono state le seguenti: prelevate di volta in volta un centinaio di uova pebrinose, esse venivano messe in un mortaietto in cui erano aggiunti 5 cc. di Ringer (soluzione isotonica con l'emolinfa del baco da seta: soluzione di NaCl all'8‰) indi il tutto veniva a lungo triturato con pestello. Si otteneva così una poltiglia che occorreva liberare da tutti i detriti del corion. La poltiglia veniva perciò introdotta in un filtro di porcellana per ottenere una grossolana filtrazione separante il liquido dalle scorie; ma poiché le scorie più minute restavano ancora ad intorbidare il liquido stesso, questo veniva poi centrifugato con centrifuga a mano, ottenendosi così la centrifugazione delle scorie ma non quella del Nosema. Compiuta questa operazione, si controllava al microscopio la presenza dei corpuscoli del Nosema nel centrifugato esaminando gocce del liquido divenuto limpido, aspirate con pipetta dalla provetta della centrifuga. I corpuscoli furono sempre riscontrati abbondantissimi. Il liquido così ottenuto veniva poi introdotto in fialete a collo lungo da 10 cc. di vetro neutro, le quali venivano sigillate alla fiamma. L'operazione

veniva ripetuta tante volte quante erano le fialete di liquido pebrinoso occorrenti per le successive operazioni di infezione sperimentale. Le fialete con il liquido pebrinoso venivano quindi sottoposte all'azione del calore (temperature diverse per tempo costante di 20') mediante il già descritto sistema del tubo a bagno-maria. In giugno si ebbero così a disposizione 3 tipi di liquidi pebrinosi, provenienti cioè da uova pebrinose di 3 periodi diversi di sviluppo, trattati a varie temperature.

Per poter ora osservare la resistenza o la morte del Nosema dopo i trattamenti al calore, abbiamo adottato il metodo di infettare coi vari liquidi pebrinosi le larve giovani sicuramente sane, condurre i normali allevamenti sotto protezione dal pulviscolo atmosferico e controllare nella larva matura la presenza o l'assenza del parassita.

Quanto alla modalità di contaminazione artificiale, dopo aver scartato l'idea di iniezioni dirette nel corpo dei bachi, per considerazioni di ordine pratico e soprattutto considerando il fatto che l'infezione da baco a baco (larva) avviene, in sede naturale, generalmente per via orale, abbiamo creduto opportuno di scegliere la somministrazione di foglia di gelso contaminata.

Aperte le fialete contenenti i diversi liquidi pebrinosi, abbiamo infettato con ciascuna fialete gruppi di foglie fresche (3-4 foglie di gelso) spalmandone col liquido le superfici e lasciando asciugare all'aria il leggero strato liquido. Queste foglie venivano date, appena asciutte, in pasto a bachi sicuramente esenti da pebrina, in 3<sup>a</sup> età, che erano stati tenuti a digiuno per 12 ore. Tali bachi provenivano da un allevamento separato ed appositamente ritardato. Ogni lotto di bachi infettato con un diverso liquido pebrinoso venne poi allevato in perfetto isolamento sotto apposita campana circolare di cellofane di circa 60 cm. di diametro, di cui solo il bordo inferiore, distanziato di 4 cm. dal tavolo, dava adito al passaggio dell'aria. Si badò inoltre, durante il normale allevamento, di iniziare la somministrazione di ciascun pasto (foglie di gelso normali) dopo accurata lavatura delle mani e disinfezione degli oggetti di uso comune.

Ogni lotto di bachi era composto di 30 individui. Il controllo dell'esistenza dell'infezione su questi bachi venne effettuato dopo 3 giorni, 6 giorni, 12 giorni dal pasto con foglie cosparse di liquido pebrinoso. Questi controlli su bachi sono stati fatti prelevando da ogni lotto successivamente 10 bachi; di ogni gruppo di 10 bachi ve-



niva fatto un pesto in mortaio con acqua distillata, il quale pesto veniva liberato nel modo già descritto dalle scorie di foglia ingerita e dai detriti dei tessuti. Alcune gocce del liquido così ottenuto venivano esaminate a fresco al microscopio. Come controllo venne tenuto un lotto di bachi infettati con le stesse modalità di cui sopra, salvo che il pesto pebrinoso usato non aveva subito alcun trattamento termico.

### Primo gruppo di esperimenti

Liquido infettante tratto da uova in avanzata diapausa.

I risultati di questo esperimento sono espressi dalla seguente tabella. Le temperature segnate sono quelle dei trattamenti al calore dei liquidi pebrinosi.

Spiegazione delle sigle adottate:

si - infezione sicura, molto accentuata

si - infezione sicura poco accentuata

? - incertezza dell'infezione dovuta a rare forme non riconoscibili con chiarezza.

no - assenza di infezione.

Temperature	3 giorni	6 giorni	12 giorni
43°	si	si	si
45°	si	si	si
47°	?	si	si
49°	?	si	si
51°	no	no	no
53°	no	no	no
Controllo	si	si	si

E' da ritenere che la spora matura a temperature superiori a + 45° C. abbia potuto subire alterazioni tali da rendere i corpuscoli della pebrina irrecognoscibili come tali.

### Secondo gruppo di esperimenti

Liquido infettante ottenuto da uova di non oltre 36 ore di età

Temperature	3 giorni	6 giorni	12 giorni
43°	si	si	si
45°	si	si	si
47°	si	si	si
49°	si	si	si
51°	?	?	?
53°	no	no	no
Controllo	si	si	si

### Terzo gruppo di esperimenti

Liquido infettante ottenuto da uova di 7 giorni di età

Temperature	3 giorni	6 giorni	12 giorni
43°	si	si	si
45°	si	si	si
47°	si	si	si
49°	si	si	si
51°	?	?	?
53°	no	no	no
Controllo	si	si	si

### Osservazioni sui risultati dei tre gruppi di esperimenti

La forma del *Nosema bombycis* sempre apparsa nei nostri esperimenti, è stata quella di spora matura. Probabilmente erano pure presenti altre forme del protozoo, ma impossibile è stato per noi una precisa constatazione al riguardo, avendo eseguito solo preparati a fresco. Per il controllo si osservi che in tutti e tre i gruppi di esperimenti si sono verificate sempre infezioni e molto accentuate sin dal terzo giorno dopo il pasto pebrinoso.

Per i bachi infettati col liquido pebrinoso trattato al calore sorgono alcuni problemi. Ci si potrebbe chiedere anzitutto come mai

dopo 3 giorni dall'infezione si sono già potute osservare spore mature nei bachi infettati con il liquido pebrinoso trattato fino a  $+ 47^{\circ}$  C. Come poteva esservi una nuova generazione con produzione finale di spore mature, quando sappiamo che il ciclo completo del *Nosema bombycis* è di almeno 4 giorni? Come abbiamo detto il liquido infettante era pebrinoso ed il *Nosema* era presente con estrema probabilità nelle varie forme del suo ciclo; era sicuramente pebrinoso in partenza, cioè prima del trattamento al calore; poteva non esserlo più dopo il trattamento, secondo il grado di temperatura raggiunto. Ora, se un dato grado di calore ( $+ 51^{\circ} + 53^{\circ}$ ) aveva ucciso il *Nosema*, questo spiegherebbe perchè, dopo una certa temperatura non si sia sviluppata più infezione nelle larve infettate. Se invece il liquido pebrinoso fu sottoposto ad una temperatura inferiore la quale non ha potuto ostacolare lo sviluppo del *Nosema*, ecco perchè nelle larve infettate si è reperito il *Nosema* stesso. Ma come mai allo stadio di spora già dopo 3 giorni dall'infezione, essendo il ciclo di 4 giorni? Se un certo grado di calore non ha influito sul *Nosema* nel liquido pebrinoso, il ciclo biologico del protozoo avrà proseguito il suo corso: i planonti ed i meronti si saranno trasformati in spore e queste avranno dato nuovi planonti e meronti e così via, di modo che il giorno dell'infezione, potendo essere i cicli del *Nosema* sovrapposti, si saranno somministrate alle larve varie forme del parassita, tra cui quindi anche quella di spora. Ci si potrebbe domandare inoltre perchè non risultino quasi mai differenze di intensità di infezione fra i 3 ed i 12 giorni dopo l'infezione per trattamenti fino a  $+ 47^{\circ}$ . Se un certo grado di calore non ha avuto influenza sul *Nosema*, è naturale che si sia potuta verificare fin dai primissimi giorni dopo il pasto pebrinoso la comparsa della infezione anche accentuata, dato che la quantità di liquido infettante somministrato sulle foglie ai bachi fu piuttosto rilevante, ed intensa fu l'infezione in partenza. Dunque l'infezione trovata nei bachi dei primi giorni non potrà essere addebitata certo totalmente allo sviluppo del parassita in essi, ma in parte almeno alle forme avanzate del parassita già preesistenti; le spore trovate il 3° giorno dopo la infezione provenivano verosimilmente da cicli già in atto.

Altro problema: come mai dopo un certo grado di calore ( $+ 51^{\circ} + 53^{\circ}$  C.) non si sono potute osservare spore in nessuna età delle larve infettate? Riconosciamo che questo punto è molto oscuro

e ci lascia assai perplessi. Sorge il dubbio che per effetto del calore le spore siano andate incontro a distruzione nel liquido pebrinoso, sicchè non abbiano più potuto non solo trasmettere l'infezione, ma neppure apparire al microscopio. Ma poichè è noto che a temperatura ordinaria la spora matura viva o morta, si conserva inalterata e quindi rimane sempre riconoscibile al microscopio, non essendosi potuta più riconoscere, ciò dovrebbe portare a concludere che essa si sia, per così dire, « disfatta ». Certo, sapendo che molto elevata è la resistenza della spora, resistenza conferitale dalla sua spessa membrana, la cosa ci appare tuttora molto problematica.

Comunque solo così, almeno in via ipotetica, possiamo spiegare la sua assenza dopo un certo trattamento termico. Naturalmente, se muoiono e si disfano le spore mature, a maggiore ragione, perchè meno resistenti, muoiono e si distruggono meronti e planonti.

Maggior vulnerabilità al calore appare presentare il *Nosema* sottoposto all'azione del calore stesso quando le uova si trovano in avanzata diapausa.

#### Quarto gruppo di esperimenti

*Trattamento al calore di uova erodepebrinose (razza Oro cinese) e allevamento dei bachi ottenuti.*

Abbiamo trattato a temperature diverse, per un tempo costante di 20' con umidità relativa costante del 90% (trattamento in termogrostat) uova che si trovavano in periodo di diapausa avanzata, provenienti da farfalle sicuramente pebrinose. Ogni lotto era composto di 200 uova; gli allevamenti dei bachi sono stati condotti tutti sotto campane di celofane, per la difesa contro reinfezioni dal pulviscolo atmosferico.

La seguente tabella indica le percentuali delle nascite, quelle dei bachi saliti al bosco e quelle degli individui trovati infetti da pebrina, comprensive sia degli individui morti durante l'allevamento, sia di quelli giunti alla forma di farfalla. La prima e la seconda percentuale sono calcolate in base alle 200 uova di partenza, la terza percentuale è invece calcolata in base alle sole uova schiuse.

Temperatura	% nascite	% bachi saliti al bosco	% infezioni pebrina
43°	90%	13%	100%
45°	91%	21%	100%
47°	88%	22%	72%
49°	86%	28%	63%
51°	70%	62%	9%
53°	26%	25%	0%
Controllo	92%	3%	100%

L'accertamento delle percentuali di infezioni da pebrina è stato effettuato al microscopio tanto sui bachi morti durante l'allevamento che sulle farfalle ottenute al termine del medesimo.

Osservando che il lotto di controllo ha avuto solo il 3% di bachi saliti al bosco ed i lotti trattati al calore hanno avuto tutti percentuali di bachi saliti al bosco superiori, ci appare lecito supporre che il calore abbia esercitato azione disinfettante su forme diverse del ciclo del *Nosema*, azione che può aver ridotto numericamente i parassiti e può aver attenuato la virulenza del parassita, come avviene in certi vaccini. Infatti i lotti trattati al disotto di + 53° C. sono stati trovati tutti più o meno infetti da pebrina, mostrando un'infezione decrescente quanto più alta era stata la temperatura del trattamento delle uova pebrinose. I bachi del lotto di controllo si sono mostrati tutti pebrinosi; i bachi del lotto di uova pebrinose trattati a + 53° C. furono tutti esenti da pebrina.

### CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti si è portati a concludere quanto segue:

- 1) Il metodo di erogazione di calore dimostratosi più efficiente è quello del termo-igrostatico.
- 2) La resistenza presentata dalle uova del *Bombyx mori* al calore è più elevata in periodo di avanzata d'apausa che non in uova di recente deposte.
- 3) La resistenza delle uova del *Bombyx mori*, a parità di temperatura, aumenta con l'aumentare dell'umidità relativa.

4) L'effetto termico provoca un acceleramento della schiusura delle uova fino a + 49° C. (uova sane - diapausa avanzata - termo-igrostatico - umidità relativa 90%). Sorpassando questa temperatura, l'effetto è invece inverso, avendosi dei ritardi delle nascite oltre ad alte percentuali di uova seccobenti.

5) La maggior vulnerabilità del *Nosema bombycis* al calore pare presentarsi allorché il seme-bachi è in stato di avanzata diapausa.

6°) Le uova pebrinose in periodo di avanzata diapausa, trattate a diverse temperature per un periodo costante di 20' e con umidità costante del 90%, presentano un'infezione pebrinosa decrescente quanto più elevata è la temperatura del trattamento.

7) La resistenza al calore da parte delle uova diminuisce con l'aumentare della temperatura, ma fino ad una temperatura di + 49° C. (diapausa avanzata - termo-igrostatico - umidità relativa 90%) l'effetto termico, per una durata di 20', non incide molto sensibilmente sul raccolto dei bozzoli.

8) Le proprietà della seta dei bozzoli ottenuti dal seme bachi sottoposto all'azione termica sono uguali a quelle ottenute da seme-bachi normale.

9) La mortalità del *Nosema bombycis* si aggira tra le temperature di + 51° C. e + 53° C., per una durata di 20'. A questa temperatura critica per il *Nosema*, la resistenza del seme-bachi è compromessa in modo tale da rendere inattuabile il metodo nella pratica industriale della confezione del seme bachi, poiché la percentuale delle nascite scende al disotto del limite tollerabile. I dati ottenuti possono formare attualmente punto di partenza per una ricerca più approfondita nella quale, a nostro avviso, si dovrebbe sperimentare più ampia gamma di trattamenti in considerazione del tempo di erogazione di calore e dei diversi stadi dello sviluppo embrionale.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ACQUA C. - *Trattamenti multipli eseguiti con una stessa soluzione acida nella preparazione del seme-bachi per la schiusura estemporanea* - Boll. Staz. Geol. e Bachicol., Vol. VII, Ascoli Piceno, 1929.
- 2) ALLEN e BRUNSON - *Control of «Nosema» disease of potato tuber worms, a host used in the mass production of «Macrocentrus ancyliivorus»* - Science, 105: 394, 1947.
- 3) CORNALIA E. - *I corpuscoli della pebrina* - Boll. Bachicol., S. II, Padova, 1885.
- 4) DICKINSON, FLANDERS, SMITH - *La denaturazione delle proteine* - Bio. J., 29: 2351, 1935.
- 5) FINNEY, FLANDERS, SMITH - *Mass culture of «Macrocentrus ancyliivorus» and its host, the potato tuber moth* - Hilgardia, Vol. XVII, 13, Berkeley, 1947.
- 6) FOÀ A. - *Modificazioni al ciclo morfologico e biologico del «Nosema bombycis» Naeg.* Boll. Lab. Zool. Gen. Agr., Vol. XVII, Portici, 1924.
- 7) GRANDORI R. - *Lo sviluppo embrionale del baco da seta: Memoria I: le prime 40 ore di sviluppo dalla deposizione dell'uovo* - Ann. Staz. Bacol., Padova, Vol. XLI, 1913.
- 8) GRANDORI R. - *Esperimenti sulla propagazione della pebrina attraverso il pulviscolo atmosferico* - Boll. Zool. Agr. Bachicol., Vol. VII, Milano, 1938.
- 9) GRANDORI R., PROVASOLI L., GIORGI D. - *Studi sperimentali intorno agli effetti di sostanze varie sulla crescita del baco da seta* - Boll. Zool. Agr. Bachicol., Vol. VII, Milano, 1938.
- 10) HAUBOWITZ F. - *Chemistry and Biology of Proteins* - New York, 1950.
- 11) KOEGLER A. - *Nutztiere Parasitologie Erster Band: Protozoologie und Entomologie* - Stuttgart, 1950.
- 12) LOMBARDI P. - *Sull'azione comparativa degli acidi nitrico e cloridrico nella schiusura estemporanea delle uova del baco da seta* - Rend. Ist. Bac. Sc. Sup. Agr., Vol. II, Portici, 1918.
- 13) PAILLOT A. - *L'infection chez les Insectes* - Paris, 1933.
- 14) PASTEUR L. - *Etudes sur les maladies du Ver-à-soie* - Paris, 1870.
- 15) PEZZINI I. - *Ricerche sul comportamento del «Nosema bombycis» nell'uovo di «Bombyx mori» durante lo sviluppo embrionale* - Boll. Zool. Agr. Bachicol., Milano, 1931.
- 16) QUAVAT E., VERNON E. - *Della conservazione del seme-bachi in ambienti diversi dall'aria atmosferica* - Ann. Staz. Bacol. Padova, Vol. VII, Padova, 1908.
- 17) REICHENOW E., DOWLEIN F. - *Lehrbuch der Protozoenkunde* - Jena, 1929.
- 18) SCHUBERTER B. - *I metodi di ricerca del «Nosema bombycis» nelle uova del baco da seta in diapausa* - L'Industria Bacologica, n. 8, Vol. III, Milano, 1929.
- 19) SCHUTTS J. H. - *An electron microscope study of the eggs membranes of «Melanoplus differentialis»* - Biol. Bull., Vol. 97, Lancaster, 1949.
- 20) STEINHAUS - *Principles of Insectes pathology* - London, 1949.
- 21) STEMPELL V. - *Ueber «Nosema bombycis» Naeg.* Archiv für Protistenkunde, Vol. XVI, Jena, 1909.

- 22) TICHOMIROFF A. - *Sullo sviluppo delle uova degli insetti* - Boll. Bachic. Padova, S. II, Padova, 1885.
- 23) VERNON E. - *La composizione chimica del guscio delle uova del Filugello* - Boll. Bachic. Padova, S. II, Padova, 1884.
- 24) VIALE G. - *Le azioni biologiche delle radiazioni* - Milano, 1934.
- 25) WEBER - *Lehrbuch der Entomologie* - Jena, 1938.
- 26) WENYON C. M. - *Protozoology* - London, 1926.
- 27) WIGGLESWORTH V. B. - *The principles of Insect Physiology* - London, 1950.