

Sulla possibilità dell'allevamento del *Bombyx mori* in ambiente sterile

Il problema dell'assenza o presenza di una flora microbica nell'interno dell'uovo di *Bombyx mori* ha già interessato un buon numero di ricercatori. Alcuni recenti lavori che annunziano la presenza di una flora microbica intraovulare ci hanno suggerito l'opportunità di eseguire nuovi esperimenti su questo argomento.

Lo MONACO e GIORGI, e più tardi MIGLIARDI O'RIORDAN, sperimentando con scrupolosa tecnica, trovarono che le uova di *Bombyx mori* sterilizzate all'esterno e messe in brodo di carne e in seguito schiacciate, non davano luogo a nessuna cultura di microrganismi.

Al contrario REBUSTELLO e TONIN, pur sterilizzando il corion delle uova di *Bombyx mori*, le trovarono infette da cocchi di una forma non bene determinata, che gli Autori però asseriscono letale per i bachi qualora questi vengano alimentati con foglia bagnata dalle colture ottenute coltivando i cocchi trovati nell'uovo.

ROSSINSKI pure trova che sul guscio delle uova di *Bombyx mori* vi sono parecchi germi che, come lo prova la lista che ne dà l'autore, sono tutti dei comuni germi dell'aria che era facile presupporre presenti sul guscio in quanto questo viene deposto e conservato nell'aria infetta comunemente da parecchie forme batteriche.

MASERA infine, lavorando su un gran numero di provette, riscontra nei tubi contenenti le uova sterilizzate e da lui schiacciate, la costante presenza di forme varie di cocchi, bacilli e muffe; però non ha determinato, colle abituali prove batteriologiche, di quali specie di microrganismi queste uova erano infette, cosa necessaria perchè, come dimostrò ROSSINSKI, nel glutine si raccolgono tutti i microbi dell'aria. Se la sgranatura non è perfetta, e se non si eseguono altri lavaggi supplementari a quelli normalmente usati nella tecnica bacologica, facilmente si possono ottenere inquinamenti da parte del glutine che si scioglie lentamente nei liquidi colturali in cui si fecero le prove, e naturalmente libera i microbi imprigionati all'atto della deposizione, quando il glutine era ancora molle, dando luogo quindi a colture microbiche. Da questi

fatti possono essere falsati i risultati dell'esperimento. Unico metodo, dunque, nel caso di batteri presenti, è di determinare la loro specie; e se si ottiene sviluppo di microbi che comunemente si trovano nell'aria, ogni dubbio può essere permesso sulla attendibilità dei risultati delle esperienze. D'altra parte, esistendo attualmente una ventina di colture sterili di insetti, alcune delle quali hanno impiego pratico generalizzato, come quelle di *Lucilia sericata*, impiegata normalmente in Francia ed in America a scopo curativo delle ferite settiche, poteva sorgere il dubbio che proprio il solo *Bombyx mori* dovesse contenere microbi intraovulari, esclusione fatta di quei microbi che ereditariamente passano dalla madre al figlio, come nel caso della pebrina e dei simbionti ereditari recentemente accertati come ospiti vitali nella *Blattella germanica* coltivata sterilmente. Ci preoccupammo di imparare la tecnica correntemente usata in Francia per tali sterilizzazioni del corion delle uova di insetti e l'applicammo al presente caso. La tecnica da me seguita è quella usata da E. WOLLMANN nei suoi classici lavori sulla sterilizzazione delle uova e sulle culture pure di *Musca domestica*, *Blattella germanica*, *Galleria melonella*. Il disinfettante impiegato per la sterilizzazione è una soluzione al 0.5 ‰ di bicloruro mercurico. Approfittai dei dati sulla resistenza delle uova di *Bombyx mori* a tale prodotto, forniti dal QUAJAT e dal PERRONCITO. Dato però che noi avremmo dovuto adoperare il bicloruro mercurico a dosi nettamente inferiori a quelle impiegate dai predetti Autori, eseguiamo una serie di ricerche personali (1) che ci dimostrarono che l'azione del bicloruro mercurico al 0.5 ‰ per 90 minuti primi provoca solo il 15% di fallanze allo schiudimento, mentre il controllo sottoposto alla stessa incubazione e agli stessi lavaggi preliminari di sgommatura ci diede il 9% di fallanze.

Chiarito questo punto, ci preoccupammo per le ragioni succitate, di sgommare il più perfettamente possibile le uova che dovevano poi essere sottoposte alla sterilizzazione del corion. Un primo lotto di uova di razza Varo che erano già state sgranate col sistema in uso nell'industria bacologica, e altri lotti di uova di Awoijku deposte in laboratorio (che furono sgommate prima col solito procedimento impiegato nell'industria), vennero lavate per 10' in H₂O distillata, accuratamente agitandole e strofinandole; successivamente furono lavate in una soluzione di bicarbonato sodico al 10% per 30 minuti, sempre agitandole e strofinandole.

Infine, per eliminare il bicarbonato sodico, si operarono tre lavaggi

(1) Nelle operazioni tecniche e nello svolgimento delle presenti esperienze mi fu di valido aiuto il laureando Leo NICCOLI; della sua intelligente ed assidua cooperazione mi è gradito qui ringraziarlo pubblicamente.

successivi di 5 minuti l'uno. Il seme fu poi messo ad asciugare su carta bibula sterile. Sono state eseguite sulla razza Varo parecchie sterilizzazioni con tempi differenti di immersione in bicloruro, e con tempi differenti di lavaggi in acqua sterile. Tali prove preliminari ci permisero di mettere a punto la seguente tecnica: tre lavaggi successivi di 5 minuti l'uno in una soluzione acquosa di bicloruro mercurico al 0.5 ‰ intercalati da due lavaggi di 4 minuti l'uno in acqua sterile, seguiti da tre lavaggi finali di 3 minuti l'uno in acqua sterile. Le uova erano poi portate in alcool a 95° per 4 minuti per togliere l'acqua e favorire un rapido essiccamento delle uova trattate. Non credemmo opportuno di ripetere la tecnica dei nostri predecessori per i metodi di ricerca degli eventuali microbi esistenti sia sul corion che nel tuorlo stesso, poichè ritenemmo che tale tecnica poteva, se non scrupolosamente eseguita, portare ad inquinamenti durante la manipolazione.

Dopo alcune prove preliminari, ci arrestammo ad un doppio controllo che ci sembra adatto ad eliminare le cause sopracitate. Le uova sterilizzate all'esterno erano direttamente prelevate dall'alcool con cucchiai di vetro previamente sterilizzati a secco, e messe in capsule di Petri sterili aventi sul fondo carta bibula sterile. L'incubazione a temperatura costante veniva eseguita in termostato. I bacolini neonati (nascite 90-95% in parecchi lotti di 100 uova l'uno) furono estratti sterilmente dalle capsule di Petri e messi in altre capsule di Petri sterili, senza carta bibula, ed ivi mediante spatole di vetro sterili, vennero pestati. Aggiungemmo circa 5 cc. di acqua sterile che mescolammo al pestato di bacolini. Il tutto fu prelevato con pipette Pasteur sterili e messo nei seguenti mezzi culturali: brodo di carne pH 7, brodo di carne glucosato pH 5.5, brodo di carne al sangue, agar brodo, agar di Sabouroud, agar sangue. I tubi, numerosi in ogni serie, furono incubati ed osservati per 30 giorni sia a + 22° che a + 37°. L'esame macroscopico dei tubi, come l'esame microscopico del fondo di ogni tubo, come le colorazioni a striscio, ci dimostrarono che *i bacolini neonati erano sterili*. Collo stesso sistema, serie di uova sterilizzate e non incubate furono pestate colla stessa tecnica e provate negli stessi terreni batteriologici *senza ottenere crescita di bacteri*.

Non contenti di queste prove e desiderosi di controllare i nostri risultati che furono ottenuti a tre riprese su parecchie serie, sia per uova di razza Varo, che di Awojiku e Verde cinese, tentammo di allevare i bacolini neonati sterili su foglia previamente sterilizzata in autoclave in grosse provette 25 × 250 mm. I bacolini prelevati con spatole sterili dalle capsule di Petri sterili in cui erano stati incubati, venivano trasportati rapidamente nei tubi sterili contenenti la foglia di gelso sterile. I bacolini dimostrarono di appetire la foglia sterilizzata e se ne cibarono largamente. Dimostrarono però una grande irrequietezza, girovagando

continuamente nei tubi e sulle foglie; tale grande irrequietezza fu fatale alla gran maggioranza di essi, poichè molti morirono annegati nell'acqua che esisteva sul fondo della provetta. Tale inconveniente fu evitato in seguito, purtuttavia dei bacolini in esperimento uno solo riuscì a superare felicemente la prima muta e fu incapace di compiere la seconda. Il funzionamento delle ghiandole della muta fu normale e accompagnato dal rigonfiamento tipico dei primi tre segmenti toracici; però i bacolini non riuscirono ad attaccarsi al substrato foglia, forse per la troppa umidità, e rimasero viventi per parecchi giorni girovagando senza fine sulle foglie, incapaci di nutrirsi e di liberarsi della spoglia della prima muta.

Tali bacolini, morti o vivi, e i loro escrementi numerosissimi, furono seminati nei liquidi culturali sopra citati, senza ottenere nessuno sviluppo di microrganismi. I mezzi culturali da noi impiegati consentono lo sviluppo, si può dire, della totalità dei microrganismi eterotrofi; infatti il brodo glucosato e l'agar Sabouroud servono allo sviluppo degli Eumiceti; il brodo di carne allo sviluppo della maggior parte degli Schizomiceti; il brodo e l'agar sangue a quello di numerosi bacteri parassiti e protozoi parassiti. Inoltre furono eseguite, in altre serie, prove in anaerobiosi con agar Veillon e gelatina, senza ottenere alcuna crescita di microbi anaerobici. Anche il brodo di Besredka-Joupille e il brodo all'uovo di *Bombyx mori* (preparati secondo il metodo del MASERA) esperimentati a due pH differenti (5,5 e 7,0) e incubati a due temperature (+ 22° e + 37° C.) sia per il pestato di uovo, sia per quello di bacolini, sia per gli escrementi di bacolini, non diedero luogo nelle nostre esperienze ad alcuna crescita di microrganismi.

Resta così, secondo noi, provato che l'uovo di *Bombyx mori* è per sua natura sterile quando deriva da femmina sana. Inoltre i nostri esperimenti hanno servito a dimostrare la possibilità dell'allevamento del *Bombyx mori* in ambiente sterile.

Già E. WOLLMAN per primo riuscì a dimostrare brillantemente che le larve di mosca domestica possono svilupparsi su alimenti sterili appropriati (escrementi di cavallo, cervella) altrettanto perfettamente e rapidamente che nell'ambiente naturale in cui comunemente vivono. Tale ambiente è fortemente inquinato di bacteri, che, prima del WOLLMAN, si credeva fossero essenziali alla digestione e alla vita di questo insetto. Dalle osservazioni di WOLLMAN comprovate da tutti gli altri Autori che ottennero colture sterili di vari insetti, risulta che i bacteri non sono indispensabili alla vita e alla digestione. Inoltre, WOLLMAN osservò una maggiore longevità nelle mosche adulte sterili, e poté provare che le larve stesse possono secernere proteasi, amilasi ed erepsina, e valersi del loro complesso enzimatico per la digestione dei cibi sterili senza l'aiuto dei bacteri. È interessante di poter aggiungere alla lista degli in-

setti capaci di assimilare le sostanze sterili, il *Bombyx mori*. Ciò anche se le esperienze da noi fatte non ci hanno ancora permesso di realizzare un completo ciclo di sviluppo dell'insetto da uovo ad uovo. Secondo noi, l'arresto nello sviluppo larvale avvenuto alla prima muta dipende principalmente da tre cause che ci sembrano essenziali: due sono da ricondursi a fattori fisici, e precisamente all'umidità eccessiva esistente nei tubi contenenti la foglia sterile e alla superficie delle foglie stesse molto bagnata, che presumibilmente non permise l'attacco coi fili sericei del corpo del baco prima della muta, attacco che è condizione essenziale allo svolgimento naturale della muta: la terza causa d'indole fisiologica, dipendente dalla cottura della foglia, che normalmente contiene abbondanti quantità di vitamine e fattori di crescita, sostanze che quasi certamente furono alterate, almeno in gran parte, dalla sterilizzazione. Ora ricordiamo che recentemente R. e L. GRANDORI dimostrarono sperimentalmente l'influenza della vitamina B₂ (lattoflavina) per la crescita del *Bombyx mori*; tale fattore è termolabile. Non abbiamo potuto superare nelle esperienze dell'anno scorso gli ostacoli sopra citati; le esperienze che intraprenderemo nella prossima stagione bacologica tenderanno ad eliminare tali difficoltà.

Tuttavia resta dimostrato fin d'ora che la crescita durante la prima età in coltura sterile è altrettanto rapida e normale che negli allevamenti comuni, e lascia sperare di poter sperimentalmente ottenere la coltura sterile per l'intero ciclo vitale del Filugello.

BIBLIOGRAFIA

- GRANDORI R. e L. — La Ricerca scientifica - 1936.
LO MONACO D. e GIORDI M. — Arch. Farm. e Scienze affini - Vol. 2^o, 1903.
MIGLIARDI O'RIORDAN — Nuovi Ann. Minist. Agric. - Anno 3^o, n. 1.
MASERA E. — Ann. Staz. Bacologica Padova - Vol. 47, pag. 71.
» » — Ann. Staz., Bacol. Padova - Vol. 47 pag. 81.
» » — Ann. Staz., Bacol. Padova - Vol. 47 pag. 85.
ROSSINSKI D. — Rendic. Spediz. studio Bachic. Europa Occidentale - Anno 1892, parte II^a
Mosca.
WOLMAN E. — C. R. Soc. Biol. Vol. 78 pag. 195.
» » — C. R. Soc. Biol. - Vol. 82 pag. 593.
» » — C. R. Soc. Biol. - Vol. 82 pag. 1208.
» » — Annales Inst. Pasteur - Vol. 36 pag. 784.
» » — C. R. Soc. Biol. - Vol. 95 pag. 164.
» » — Arch. Intern. Physiol. - Vol. 18, pag. 194.