

MECCANISMO PATOGENETICO DELLA MORTE DELLE GAMBUSIE PER EFFETTO DEI PRODOTTI PUTREFATTIVI.

In altra nota ⁽¹⁾ ho riferito:

a) che per effetto dei prodotti della putrefazione — nel caso specifico si trattava di sostanze alimentari — le gambusie vanno soggette a sofferenze, che progressivamente aggravandosi le conducono a morte;

b) che la morte delle gambusie può essere evitata ed aversi un loro quasi immediato ritorno allo stato normale, trasferendole in nuova *aqua fontis*, pure quando sono ridotte agli estremi e perfino apparentemente perite ⁽²⁾.

Indaghiamo ora il meccanismo genetico di questi fenomeni.

Sarebbe facile spiegare l'esito letale di cui in *a*), ammettendo che i prodotti putrefattivi fossero tossici per le gambusie e determinassero, in esse, lesioni anatomiche mortali. A tale spiegazione, però, contrasterebbe il fatto accennato in *b*), la subitanea reviviscenza, cioè, delle gambusie stesse, con pronto ritorno allo stato normale, in seguito a tempestivo miglioramento delle condizioni ambienti. Ciò si accorderebbe meglio, invece, coll'intervento di un fattore capace di provocare solo disturbi di carattere funzionale e quindi di più facile e soprattutto di più sollecita compensazione e scomparsa che non quelli dipendenti da lesioni cellulari: i disturbi di quest'ultimo genere sono, infatti, più persistenti e duraturi, non scomparendo che lentamente e gradatamente via via che le lesioni cellulari vanno riparandosi, dopo cessata l'influenza dell'agente patogeno che le ha cagionate.

Comunque, che i suddetti fenomeni dipendano dai prodotti putrefattivi è indiscutibile, ma per qual meccanismo questi agiscono? Poichè sembra da escludersi che agiscano per il loro potere tossico, occorre prendere in considerazione qualche altra loro proprietà. E' quanto si è fatto studiando l'influenza della *sottrazione di ossigeno*, che — con immane ripercussioni sulle condizioni di vita offerte alle gambusie — i pro-

dotti putrefattivi operano, a causa del loro noto *potere riducente*, nel mezzo in cui si originano e si diffondono. E per eliminare ogni dubbio che i risultati degli esperimenti in proposito non fossero da attribuirsi alla sottrazione di ossigeno, la si è promossa, anzichè con sostanze putrescibili, con espedienti più semplici, ma di uguale effetto in quanto atti a procurare, per via diretta o indiretta, una progressiva diminuzione dell'ossigeno ambiente.

A) In un pallone della capacità di 1500 cmc. si introducono 1 litro di *aqua fontis* e 5 gambusie e lo si pone in comunicazione, mediante tubo di gomma, con altro pallone della capacità di mezzo litro, contenente 400 cmc. di soluzione di pirogallato potassico — sostanza, come si sa, ad azione riducente — allestita sul momento, sciogliendo, in 400 cmc. di acqua, 10 grammi di acido pirogallico e 10 grammi di idrato potassico. Si sistema il tutto in modo da avere un ambiente — I) — ermeticamente chiuso, onde evitare l'afflusso di aria.

Altra coppia — II) — di uguali palloni, sistemati nello stesso modo, si allestisce per servire da controllo, sostituendovi con 400 cmc. di acqua semplice, i 400 cmc. di soluzione di pirogallato potassico.

Tanto nell'una che nell'altra coppia di recipienti si ha, dunque, una massa di circa 600 cmc. di aria stagnante, che, però, nella I), a differenza che nella II), viene con maggior sollecitudine sempre più impoverita di ossigeno, perchè via via assorbito dal pirogallato.

Senza dilungarmi in tanti dettagli, mi limiterò a notare, di questo esperimento, solo le due fasi più importanti dal nostro punto di vista e cioè:

1° nella coppia I) di recipienti, le gambusie dopo 10 giorni stanno tutte alla superficie dell'acqua e non se ne allontanano neppure in seguito ad improvvisi stimoli, quali i ripetuti urti contro la parete esterna del vaso, mentre nella coppia II) compiono ancora le loro consuete normali evoluzioni;

2° nella coppia I) di recipienti, le gambusie muoiono tutte in 14 giorni, mentre nella coppia II) qualche gambusia sopravvive fino a 96 giorni.

Ha dunque effetto deleterio la sottrazione di ossigeno, la cui progressiva deficienza, raggiunto un certo limite, determina la morte delle gambusie.

B) In due cilindri di vetro, muniti di piede, alti 30 centimetri, del diametro interno di 7 centimetri, e quindi della capacità di circa 1 litro, si introducono mezzo litro di *aqua fontis* e 5 gambusie.

Si provvede a sottrarre in uno dei cilindri (cilindro I) la superficie libera dell'acqua dal contatto diretto coll'aria atmosferica, ricoprendola con una sostanza oleosa inerte — olio di paraffina — in quantità sufficiente a formarvi uno strato continuo, dello spessore di circa 1 centimetro. L'altro cilindro (cilindro II) si lascia, per controllo, senza olio.

Riassumendo gli esiti delle molteplici prove eseguite e schematizzando alquanto, ecco come si svolge l'esperimento nel cilindro I):

1^a fase: Fino a quando non si aggiunge l'olio, le gambusie compiono — al pari che nel cilindro II) — escursioni verticali di ascesa e di discesa per tutta l'altezza della colonna idrica, che è di circa 15 centimetri. Ma versato l'olio, pare avvertano quasi subito il cambiamento delle condizioni ambienti, per una influenza esplicantesi alla parte superiore della colonna liquida, da dove, perciò, si allontanano portandosi — e trattenendovisi — verso il fondo del recipiente.

Questa prima fase dura 15-20 minuti.

2^a fase: Alle nuove condizioni dell'ambiente — che per il momento non differiscono molto da quelle del cilindro II) — le gambusie si adattano facilmente e riprendono, quindi, ad estendere le loro escursioni verticali per tutta l'altezza della colonna idrica. Non tornano però a comportarsi proprio come nel cilindro-controllo, perchè in questo, non di rado, si intrattengono qualche momento — natanti in senso orizzontale — anche alla superficie libera dell'acqua, mentre nel cilindro I) si mostrano alquanto agitate e ad espressione della molestia — se non ancora vera e propria sofferenza — che già risentono, appena giunte al piano di contatto tra acqua ed olio se ne riallontanano, ridiscendendo immediatamente quasi fossero respinte da una forza ripulsiva.

Questa seconda fase, la più duratura, si prolunga per 15-20 ore.

3^a fase: Le gambusie cessano le escursioni verticali e finiscono col mantenersi tenacemente — natandovi in senso orizzontale — alla parte superiore della colonna idrica, in corrispondenza del piano di contatto tra acqua ed olio, senza più allontanarsene, come fanno invece in un primo tempo, neppure se eccitate da improvvisi stimoli, consistenti in ripetuti urti contro la parete esterna del vaso. Compiono, tuttavia, di

tanto in tanto, movimenti energici, compreso qualche subitaneo e violento guizzo con cui si spingono in alto entro lo strato di olio e perfino al di fuori di esso. Ma in seguito, i movimenti vanno affievolendosi, fino a ridursi a qualche raro, lento e breve spostamento orizzontale.

Questa terza fase dura 1-2 ore.

4^a fase: E' la fase finale, che può dirsi del naufragio delle gambusie. A guisa di corpi gravi ed inerti esse affondano lentamente, quando, ad un certo punto della discesa, con una reazione brusca ed energica risalgono al livello primitivo, cioè al piano di contatto tra acqua ed olio. Alle successive ripetizioni dell'affondamento, le gambusie reagiscono sempre più debolmente, riuscendo perciò a risalire per un tratto di volta in volta minore, finchè cessano di reagire e cadono al fondo del recipiente, ove rimangono immobili e muoiono, oppure con supremi sforzi riescono a spingersi ancora per qualche volta alla parte superiore della colonna idrica, per finire sempre, però, col ricadere al fondo ed ivi morire.

Questa quarta fase dura 15-20 minuti.

In contrasto con quanto sopra, nel cilindro II), quello cioè di controllo, le gambusie nel frattempo non risentono alcun disturbo e si mantengono ancora in vita in istato perfettamente normale.

Poichè l'unica differenza nelle condizioni ambienti dei due cilindri è che nel II) si ha libero afflusso di aria, impedito invece nel I), la causa essenziale delle sofferenze e della morte delle gambusie in quest'ultimo è evidentemente il mancato apporto di ossigeno atmosferico. Una deficienza di ossigeno, incompatibile colla vita delle gambusie, non manca dunque di raggiungersi, anche impedendo soltanto il libero afflusso di aria nell'ambiente idrico, e ciò, perchè allora l'ossigeno via via consumato dalle gambusie stesse, per soddisfare le loro esigenze vitali, nel cilindro I) non può venir compensato, come lo è nel II).

A partire dalla immissione delle gambusie nell'acqua fino alla loro morte, l'esperimento — date le condizioni in cui si svolge — nel cilindro I) dura una ventina di ore. Ma può durare anche più o meno, variando il volume dell'acqua, il numero e la grossezza delle gambusie, la temperatura ambiente, ecc. elementi tutti che, in definitiva, influiscono sul momento in cui interviene il fattore decisivo dell'esito letale: la deficienza di ossigeno.

C) Nel cilindro I) dell'esperimento *B*), senza cambiarvi l'acqua, nè eliminarvi l'olio, si introducono altre 5 gambusie, in sostituzione di quelle morte.

Le varie fasi, e specialmente la seconda, risultano allora molto abbreviate, onde si giunge all'esito letale in un lasso di tempo molto minore e che va da una trentina di minuti a qualche ora.

Quando l'esperimento dura qualche ora, facendo seguire, alla seconda, una terza immissione di gambusie, la sua durata si abbrevia ancora e non oltrepassa di solito i 30 minuti.

Questa sempre minore sopravvivenza delle gambusie dipende, naturalmente, dal progressivo peggioramento delle condizioni ambienti e, in sostanza, dal progressivo accentuarsi della deficienza di ossigeno, conseguente alla successiva ripetuta permanenza di nuove gambusie nell'acqua, che diviene, quindi, sempre meno adatta a mantenerle in vita.

D) Si libera dall'olio l'acqua del cilindro I), che ha già servito per gli esperimenti della serie *B*) e *C*), e si provvede a riaerearla, travasandola più volte da uno in altro recipiente ed esponendola per qualche tempo al libero contatto coll'aria atmosferica. Ciò fatto, si allestisce un II) cilindro con acqua nuova — cioè non usata — e si introducono sia nel I) che nel II) cilindro cinque gambusie. Queste si comportano in ambedue i cilindri:

a) come di norma e vi sopravvivono a lungo, se si lascia l'acqua priva di olio;

b) come nel cilindro I) dell'esperimento *B*), se si versa sull'acqua il solito strato di olio;

c) come nell'esperimento *C*), se, atteso che siano morte tutte le 5 gambusie sottoposte all'esperimento del comma *b*), si sostituiscono con altrettante vive.

Basta dunque riaereare l'acqua usata in precedenti esperimenti — quale, nell'attuale serie *D*), è quella del cilindro I) — perchè le gambusie vi si comportino precisamente come in acqua nuova, del pari provvista, o non, di olio.

E) Introdotto mezzo litro di *aqua fontis* in un cilindro — I) — vi si versa subito l'olio e si lascia a sè, per più giorni, senza gambusie. Al

momento di immettervele, si asporta tutto l'olio e si allestisce, per controllo, un altro cilindro uguale — II) — pure con mezzo litro di acqua e con gambusie, senza olio: le gambusie sopravvivono a lungo in ambedue i cilindri e vi si comportano come di norma. Vi si comportano invece:

a) come nel cilindro I) dell'esperimento *B*), se, al momento di immettervele, anzichè estrarre l'olio dal cilindro I), lo si aggiunge anche al II);

b) come nell'esperimento *C*), alle ripetute successive immissioni di nuove gambusie, in sostituzione delle precedenti morte, se i cilindri si lasciano provvisti di olio.

Questa serie di esperimenti, mentre da un lato dimostra che in assenza di gambusie la sola esclusione, anche prolungata, del libero afflusso di aria non provoca di per sè condizioni ambienti incompatibili colla sopravvivenza delle gambusie per deficienza di ossigeno, dall'altro conferma che tale deficienza si stabilisce colla concomitante presenza di esse e che va sempre più aggravandosi, alle loro ripetute successive immissioni.

F) Anzichè coll'olio — come negli esperimenti della serie *B*) — si può escludere l'afflusso dell'aria mediante chiusura ermetica dei recipienti con tappo di gomma o di sughero:

Cilindro I), della capacità totale di circa un litro: si riempie di acqua in modo che alla chiusura col tappo vi rimanga compresa una più o meno grossa bolla d'aria. Le dimensioni del cilindro sono tali, che la colonna idrica vi raggiunge l'altezza di 27 centimetri.

Cilindro II), di capacità maggiore del I): introdottavi la medesima quantità di acqua ed applicatovi il tappo, vi rimane una camera d'aria di circa 150 cmc. La colonna idrica è di 22 centimetri di altezza.

Cilindro III), di capacità maggiore del II): introdotta qui pure la medesima quantità di acqua ed applicato il tappo, vi rimane una camera d'aria di circa 250 cmc. La colonna idrica raggiunge 15 centimetri di altezza.

Le gambusie, immesse nel solito numero di 5 in ognuno di questi cilindri, compiono tranquillamente le consuete escursioni verticali per tutta l'altezza della colonna idrica nei cilindri II) e III), solo per la metà

inferiore di essa nel cilindro I): ciò, non tanto per la maggiore altezza che quivi assume la colonna liquida, quanto piuttosto perchè, per assenza di una non indifferente raccolta di aria — quale, invece, si ha negli altri due cilindri — le gambusie ne avvertono immediatamente il mancato libero afflusso, per ostacolo frapposto alla parte superiore della colonna stessa (³).

Adattatesi alle condizioni ambienti, le gambusie compiono le loro escursioni per tutta l'altezza della colonna idrica anche nel cilindro I), ove, però, dopo qualche ora, — e cioè quando forse l'aria dissolta nell'acqua è diminuita oltre un certo limite — cominciano ad avere delle sofferenze, che le inducono a raccogliersi alla parte superiore della colonna liquida, attorno alla bolla d'aria ivi esistente. Eccitate — per esempio con ripetuti urti contro la parete esterna del cilindro — le gambusie dapprima reagiscono approfondandosi, non senza dimostrare la loro preferenza per la superficie dell'acqua ritornandovi subito e sempre attorno alla bolla d'aria; in seguito non reagiscono più e si mantengono tenacemente attorno alla bolla d'aria, ove, per il progressivo peggioramento del loro stato, finiscono col morire tutte quasi contemporaneamente. A tale esito — nelle condizioni sperimentali indicate — si giunge in 15-20 ore.

In questo frattempo nulla di anormale mostra invece il comportamento delle gambusie nel II) e nel III) cilindro, ove nessuna di esse perisce prima di 5 o 6 giorni, e qualcuna, specialmente nel III), sopravvive anche oltre 10 giorni.

Questi esperimenti, mentre confermano che il mancato libero afflusso di aria accelera sempre la morte delle gambusie, dimostrano pure che la presenza di una non indifferente — per quanto non eccessiva — raccolta di aria, anche stagnante, basta a permettere che esse sopravvivano ben più a lungo che non quando detta raccolta manca del tutto, o quasi.

G) E più a lungo ancora — come risulta dall'esperimento — le gambusie sopravvivono, quando, pur riempiendo d'acqua i cilindri, la chiusura col tappo non ne è ermetica, ma dà adito ad un afflusso continuo — sebbene assai limitato — di aria, con conseguente continuo apporto di ossigeno atmosferico.

Aggiungiamo, infine, che in tutti questi esperimenti si possono far rivivere le gambusie ridotte agli estremi e perfino apparentemente morte, trasferendole in acqua non sottratta al libero afflusso di aria, e quindi di ossigeno atmosferico; allo stesso modo che negli esperimenti con sostanze putrescibili (l.c.) si è notato potersi avere la reviviscenza delle gambusie, sottraendole tempestivamente all'influenza dei prodotti putrefattivi.

Visto che negli esperimenti di questa nota la morte delle gambusie è, dunque, sempre dovuta a deficienza di ossigeno, richiamiamo in particolare l'attenzione sugli esperimenti delle serie *B*) e *F*) — riferiti più dettagliatamente — perchè dimostrano che il quadro fenomenologico provocato dalla sottrazione di ossigeno coincide, nel complesso, con quello determinato dai prodotti putrefattivi (l.c.). Appare quindi giustificato tenere che questi pure agiscano attraverso il meccanismo della sottrazione di ossigeno dall'ambiente, cagionandovene — come il pirogallato potassico (serie *A*), la stratificazione di olio sull'acqua (serie *B*), la chiusura ermetica dei recipienti (serie *F*) — una progressiva deficienza, che giunge ugualmente a rendersi incompatibile colla vita delle gambusie. E ciò — a differenza che negli attuali esperimenti delle serie *A*), *B*), *F*) — nonostante il continuo libero afflusso di aria, probabilmente perché i prodotti putrefattivi in progressivo aumento, a causa della loro funzione riducente finiscono per sottrarre *tutto* l'ossigeno via via apportato all'ambiente idrico dall'aria che vi sta a diretto contatto, e nei riflessi delle gambusie tale apporto è da allora inutile e come non avvenisse, al pari di quanto appunto si verifica negli esperimenti delle serie *A*), *B*), *F*).

Essendo ovvio poi, che una stessa causa abbia a procurare sempre il medesimo effetto, la progressiva deficienza di ossigeno, ogniqualvolta e comunque si verifichi, darà luogo alla sua naturale conseguenza, cioè all'*asfissia*. Ecco, in conclusione, la causa ultima delle sofferenze e della morte delle gambusie negli esperimenti con sostanze putrescibili (l.c.) ed in quelli con altri espedienti ad uguale effetto (pirogallato potassico, stratificazione di olio sull'acqua, chiusura ermetica dei recipienti) ed ecco pure perchè, eliminata tempestivamente la deficienza di ossigeno, ha luogo

il pronto ristabilimento delle gambusie stesse (⁴) anche ridotte agli estremi e perfino ormai apparentemente perite.

Quanto in via sperimentale avviene in proporzioni necessariamente limitate, può verificarsi, in particolari circostanze, in natura in proporzioni incomparabilmente più grandiose. Ecco un episodio del genere, osservatosi qualche anno fa a Parigi, nella Senna, e così riferito dai giornali quotidiani:

Per il caldo torrido che imperversava, una mattina, fra il ponte di Austerlitz e lo sbarramento di Suresnes, migliaia di pesci di ogni sorta galleggiavano, morti, nell'acqua torbida. Presso una piccola sorgente che si getta nella Senna altre migliaia di pesci si affollavano per respirare nell'acqua pura, e si potevano prendere colle mani, essendo tutti semi-asfissiati. Si spiegò il caso col fatto che il calore avesse provocato la fermentazione del fango accumulatosi in fondo al fiume e ne fosse derivato un inquinamento dell'acqua, per cui i pesci si erano portati alla superficie in cerca di ossigeno.

Ho riportato questo episodio naturale, per l'interesse che assume nei confronti dei nostri esperimenti, coi quali non manca di avere molteplici punti di contatto. Ne sono esempio:

a) la preferenza che ad un certo momento, i pesci mostrano per la superficie dell'acqua, ove si portano in cerca di ossigeno;

b) l'affollarsi dei pesci allo sbocco di una sorgente di acqua pura — allo stesso modo che attorno ad una bolla d'aria nel cilindro I) del nostro esperimento *F*) — per trovare condizioni ambienti più tollerabili;

c) l'apatia dei pesci, per cui si lasciano catturare direttamente colle mani;

d) il movente dell'episodio, che — come nel caso delle sostanze putrescibili — risiede in un processo fermentativo, che ha per effetto l'asfissia dei pesci.

RIASSUNTO

Ricordato un suo precedente studio, da cui risulta come in presenza di sostanze alimentari in putrefazione le gambusie:

a) vadano soggette a sofferenze che, progressivamente aggravandosi, le conducono a morte;

b) presentino un quasi immediato ritorno allo stato normale, qualora vengano tempestivamente trasferite in nuova *aqua fontis*;

l'A., in base a varie considerazioni e ad ulteriori indagini sperimentali, ritiene di poter escludere che la morte delle gambusie sia dovuta essenzialmente alla tossicità, per esse, dei prodotti putrefattivi, e la riporta, invece, ad un processo di asfissia determinato da detti prodotti, che per la loro nota funzione riducente, giungono a cagionare una deficienza di ossigeno, incompatibile colla vita delle gambusie.

Rimarrebbe così spiegato anche il fatto che, eliminata tempestivamente tale deficienza di ossigeno, ha luogo un pronto ristabilimento delle gambusie, spesso sotto forma di repentina e subitanea risurrezione.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Lab. di Batteriologia. Settembre 1938-XVI.

BIBLIOGRAFIA

(¹) M. PERGOLA - « Recherche biologique des produits de la putréfaction au moyen de la « *Gambusia aff.* » - Bollettino della Sez. Italiana della Società Internazionale di Microbiologia, 1934.

(²) Deve invero trattarsi di morte apparente, perchè in caso contrario non si avrebbe la reviviscenza delle gambusie.

(³) Si notino, qui ed in seguito, le analogie tra il comportamento delle gambusie nell'esperimento in parola e quello osservato nel cilindro I) dell'esperimento B) durante la 1^a, 2^a e 3^a fase.

(⁴) Talvolta, sebbene eccezionalmente, questo ristabilimento delle gambusie non è tanto rapido, richiedendo qualche ora per compiersi.

