

LE AMEBE DI ACQUA DOLCE

MARISA LEONARDI CIGADA

Istituto di Zoologia di Milano.

L'ameba, questa piccola masserella di protoplasma vivente, è dall'uomo della strada reputata un po' il simbolo della primitività. È infatti facile sentire dire: dall'ameba all'uomo per sintetizzare l'evoluzione, sebbene è molto improbabile che qualche cosa di più o meno simile a un'ameba figurì fra i nostri lontani antenati precambriani. Alla proverbiale semplicità dell'ameba si contrappongono complessi meccanismi fisiologici presenti in questi Protozoi, per esempio i processi di osmoregolazione e di escrezione ai quali si devono aggiungere i processi di riproduzione. I processi di osmoregolazione e di escrezione si realizzano principalmente per mezzo del vacuolo pulsante (Fig. 1), che è presente in tutte le amebe di acqua dolce, perchè serve a rigettare gli eccessi di liquidi che si creano in queste forme, ipertoniche con l'ambiente; tale organello manca nelle forme marine isotoniche con l'ambiente. In questo caso tutti i prodotti catabolici passano attraverso la parete del corpo dell'ameba per diffusione. Finley ha dimostrato che l'*Amoeba verrucosa* perde il suo vacuolo pulsante se al mezzo in cui vive si aggiunge NaCl.

Le ricerche, a cui qui mi riferisco,

sono iniziate con lo studio del ciclo riproduttivo delle amebe, i cui meccanismi sono apparsi assai complessi.

Nelle acque di Lombardia è assai comune l'*Amoeba spumosa* Grüber (Fig. 1); misura circa 80-100 μ di diametro, vive appiattita al substrato con forma spesso a ventaglio, presenta una parte posteriore (uroide) piuttosto evidente, pseudopodi estesi, appiattiti, determinati; (l'ameba cioè si muove per correnti citoplasmatiche e gli pseudo-

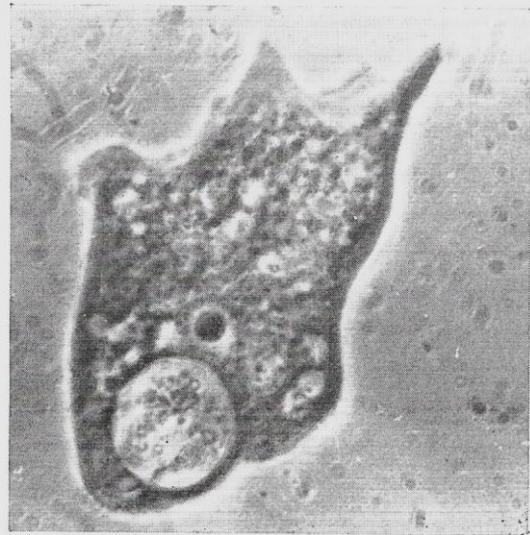


Fig. 1 - *Amoeba spumosa* Grüber con vacuolo pulsante ($\times 800$).

podii hanno forma e grandezza definita), il nucleo è sferico, compatto, l'ectoplasma ialino e l'endoplasma moderatamente pieno di cristalli, con numerosi vacuoli che raggiungono anche i 30 μ di diametro.

Si è potuto accertare che le amebe

modi di riproduzione, ai quali generalmente ricorrono quando non si trovano in condizioni ambientali ottimali (Fig. 2). Del resto questo comportamento è comune a molti Protozoi e risponde a una esigenza insita in ogni vivente: la conservazione della specie.

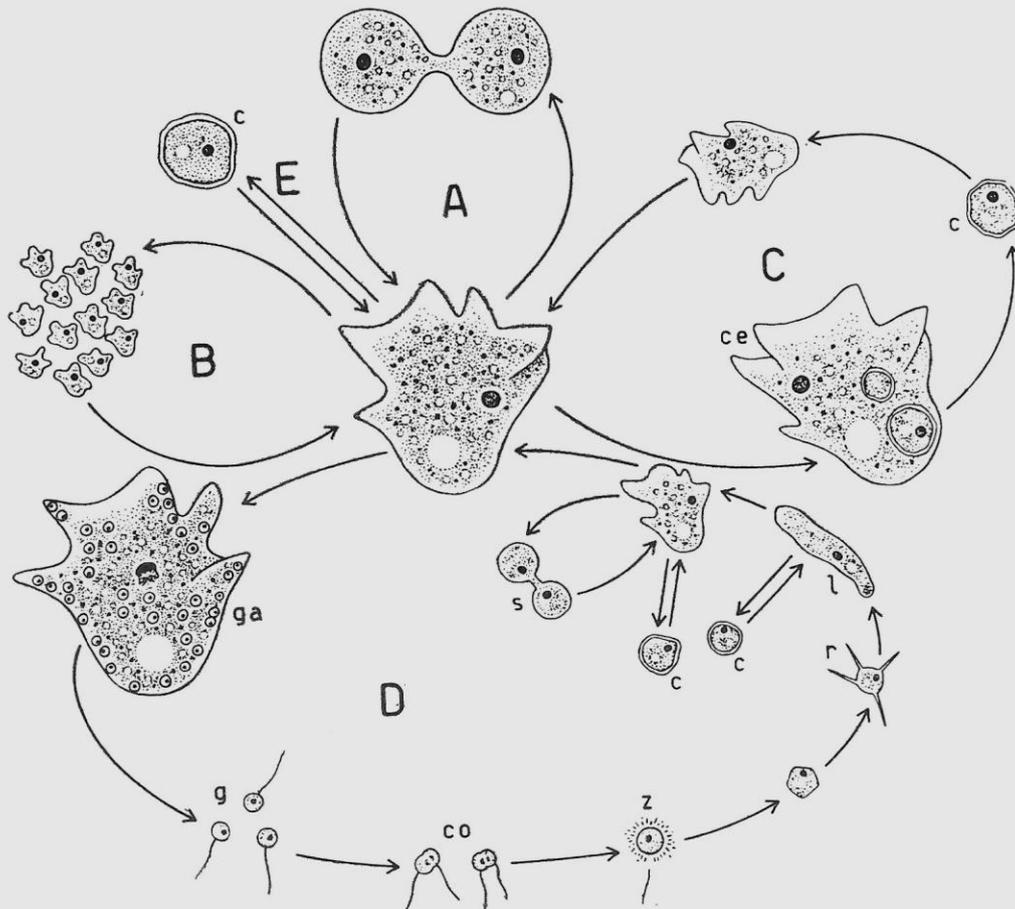


Fig. 2 - Ciclo biologico della *A. spumosa* A) = riproduzione per scissione, B) = divisione multipla, C) = formazione di cisti endocellulari, D) = riproduzione sessuata, ga = gametogenesi, g = gameti, co = copulazione, z = zigote, r = forma radiosa, l = forma limax, c = cisti.

di questa specie, oltre alla riproduzione per scissione, in cui il nucleo si divide per un processo mitotico che si effettua senza rottura della membrana nucleare, possono presentare anche altri

L'ameba può riprodursi per un fenomeno di scissione multipla, durante la quale il nucleo si divide in tante masserelle intorno alle quali si organizza del materiale citoplasmatico. Inol-

tre nell'endoplasma dell'ameba possono formarsi delle cisti endocellulari le quali, con la degenerazione dell'ameba che le ha prodotte, si liberano nel mezzo di coltura dove possono schiudere. Ho potuto osservare nell'*Amoeba spumosa* anche una riproduzione sessuata. Si manifesta in colture allevate alla luce in infuso di fieno, a temperatura ambiente. Il nucleo dell'ameba, che allo stadio vegetativo è sferico e compatto, perde questi caratteri; probabilmente la membrana si rompe e del materiale nucleare passa nel citoplasma; dalla ameba escono poi delle piccole forme flagellate del diametro di circa $6\ \mu$ che si copulano e danno origine a uno zigote. Droops partendo dalle mie ricerche ha studiato questo processo sessuale in una ameba difasica (e cioè con uno stadio vegetativo a volte ameboide, a volte flagellato) appartenente al genere *Heteramoeba* e si è accorto che i gameti che si copulano debbono venire da due diversi individui senza che per altro esistano due sessi differenziati.

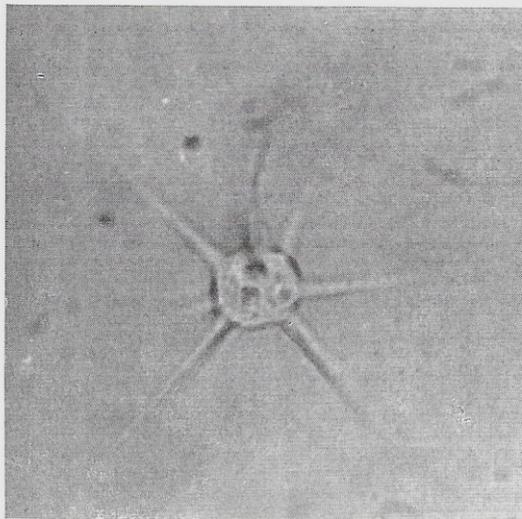


Fig. 3 - *Forma radiosa* ($\times 1.000$).

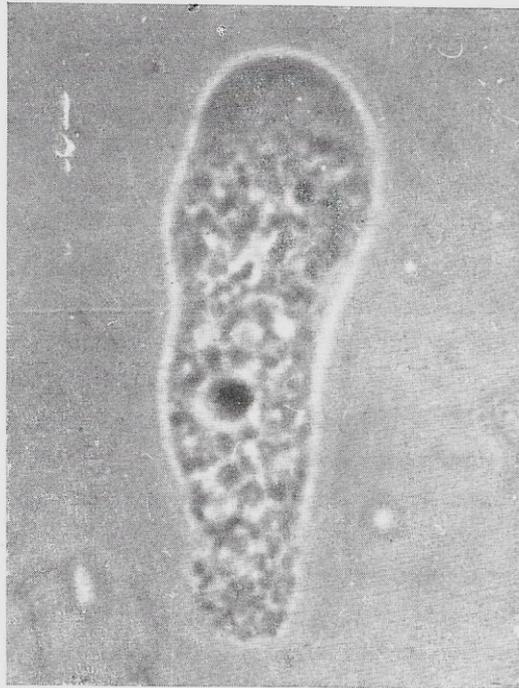


Fig. 4 - *Forma limax* ($\times 1.800$).

Dallo zigote dell'*Amoeba spumosa* si libera una forma a pseudopodi appuntiti, stellata: è questa una piccola ameba *radiosa*, di $10\ \mu$ di diametro (Fig. 3). Questa piccola ameba si accresce e passa attraverso uno stadio in cui ha l'aspetto corrispondente alla *Amoeba limax* (Fig. 4), cioè di un'ameba priva di pseudopodi (o se si vuole con un solo pseudopodo anteriore) che si muove rapidamente per correnti citoplasmatiche, con movimento serpentino. Questa forma si accresce e si metamorfosa poi trasformandosi in una ameba di aspetto di *Amoeba spumosa*, già in grado di dividersi, ma che ha dimensioni piccole e che acquisterà in seguito le dimensioni dell'individuo adulto. Occorrono circa trenta o quaranta giorni per lo svolgersi dell'intero ciclo. Dopo quaranta giorni dalla gametogenesi le colture sono ricche di

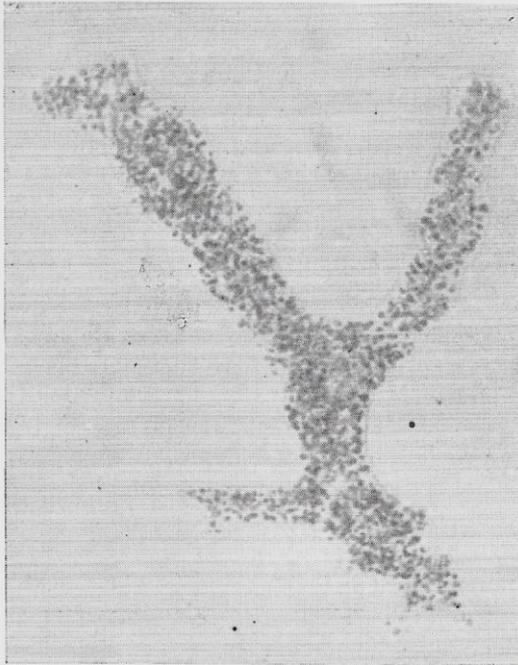


Fig. 5 - *A. proteus* Leidy ($\times 110$).

amebe giovani che si dividono per scissione e in particolari condizioni ambientali, per esempio quando le colture sono vecchie, ripetono i fenomeni di sessualità⁽¹⁾.

Questo ciclo è stato messo a punto isolando una singola ameba in un vetrino a goccia pendente, seguendone il ciclo al microscopio e fotografando gli stadi che si susseguivano.

La presenza nel ciclo dell'*Amoeba spumosa* di forme con aspetto di *radiosa* e di *limax*, mi ha posto il problema dell'esistenza di queste specie e la conseguente necessità di indagare su tutta la sistematica di questo gruppo di Protozoi, sistematica che si presenta confusa e imprecisa.

(¹) Se si aggiunge al liquido di coltura un analogo delle purine (7 idrossi-triazolpirimidina ovvero 8 azaguanina) si ottiene la gametogenesi.

Ho così iniziato a raccogliere del materiale in natura per vedere la distribuzione delle amebe, la loro ecologia e la loro sistematica. I dati raccolti sono ancora incompleti, ma quanto fino ad ora osservato permette alcune osservazioni e precisazioni.

Innanzitutto si è visto che l'*Amoeba spumosa*, la specie di cui noi alleviamo i ceppi da più di dieci anni, è la specie senz'altro più diffusa nella pianura lombarda e nelle zone limitrofe. L'*A. spumosa* è stata trovata durante tutto l'anno e praticamente si è vista presente in tutti gli ambienti studiati dove vi erano amebe. Presenta diversità di dimensioni e di inclusi nel suo endoplasma nelle diverse località, senza che per ora sia stato possibile individuare delle razze locali.

Ricerche sulla distribuzione altimetrica di questa specie hanno segnalato la presenza dell'*Amoeba spumosa* nelle prealpi fino a 2000 m. di altitudine: ignoro se ci sia a quote più alte.

Inoltre si è potuto accertare quanto intuito dallo studio del ciclo biologico dell'*Amoeba spumosa*: la non validità, da un punto di vista tassonomico, delle *A. radiosa* e *A. limax* (Figg. 3, 4); queste amebe si presentano come forme di transizione in grado di metamorfosare in individui classificabili ad altre specie; esse rispondono cioè ad aspetti che può assumere un'ameba in determinati momenti del suo ciclo biologico o in rapporto a determinati fattori ambientali. L'*Amoeba spumosa* adulta può infatti assumere aspetto di *limax* quando si trova in un brodo di coltura troppo vecchio e il cambiamento di una forma nell'altra è reversibile.

Secondo Bovee lo stesso avverrebbe per la *radiosa* che secondo lui, sarebbe uno stadio transitorio di altre forme di amebe legato a fattori ambientali. Io

concordo con Bovee e, per quanto mi risulta, la forma *radiosa* è l'ameba che esce alla cisti dello zigote sia per l'*Amoeba spumosa* sia per l'*A. proteus*.

La presenza di amebe della specie *A. proteus* (Fig. 5), cioè delle grandi amebe di acqua dolce, è piuttosto eccezionale; si sono trovate solo rare volte: nel lodigiano, in un ambiente coperto di lemne (in primavera); in una lama tranquilla del Sesia dove le acque al centro raggiungono il metro di profondità, con alghe sul fondo (in marzo); nel fiume Grandone, in un'ansa dove l'acqua scorre debolmente o è ferma: il luogo è molto ombreggiato per l'abbondante vegetazione (in aprile); in un piccolo canale d'irrigazione della bergamasca, con acque ferme (in maggio).

Si sono spesso potute pescare amebe che rispondono alla descrizione dell'*Amoeba verrucosa* (Fig. 6) e dell'*Amoeba vespertilio* (Fig. 7). Purtroppo non sono mai riuscita ad allevare questi ceppi: il passaggio dall'acqua dell'ani-

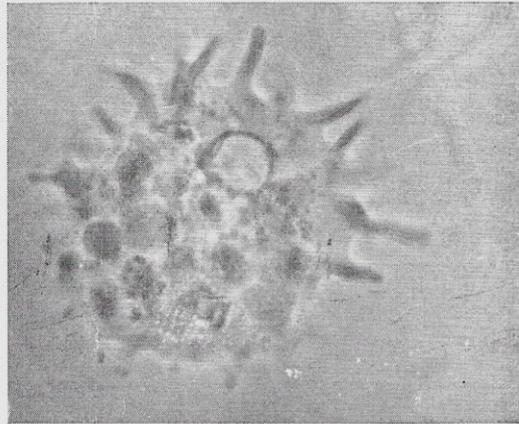


Fig. 7 - *A. vespertilio* Penard ($\times 600$).

biente naturale al brodo di fieno o ai vari liquidi debolmente ipertonici usati per gli allevamenti non è sopportato e, anche prolungando la permanenza nell'acqua di raccolta, queste amebe sopravvivono solo qualche settimana senza riprodursi e poi scompaiono dalle colture, oppure sono sostituite da forme di *spumosa*. Questo fatto verificatosi più volte, anche quando la *verrucosa* o la *vespertilio* erano state rigorosamente isolate, mi ha fatto pensare a una possibile metamorfosi anche per queste forme, ma solo controlli più accurati, ora in atto, potranno risolvere questa questione.

Nelle acque della pianura padana è piuttosto facile trovare forme (Fig. 8) con caratteri intermedi tra quelli dell'*Amoeba spumosa* e quelli dell'*Amoeba proteus*; cioè forme con una dimensione che si aggira sui 200-250 μ , (la *A. spumosa* misura circa 80 μ , l'*A. proteus* circa 500 μ). Il nucleo di queste forme si presenta compatto, sferico come quello dell'*Amoeba spumosa* (e delle forme *radiosa*, *vespertilio*, *verrucosa*, *limax*, mentre l'*A. proteus* presenta nucleo a biscotto con caratteristici granuli cromatinici alla periferia) ma gli

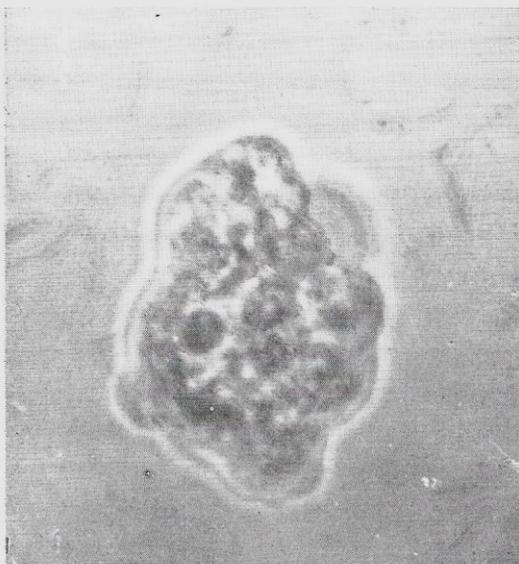


Fig. 6 - *A. verrucosa* Ehrenberg ($\times 400$).

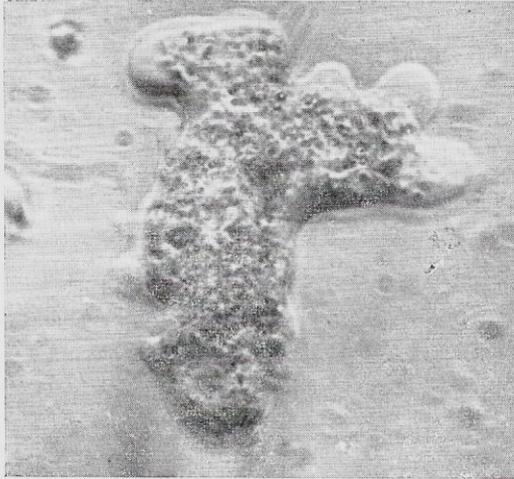


Fig. 8 - A. « tipo proteus » ($\times 400$).

pseudopodi hanno l'aspetto lobato di quelli dell'*Amoeba proteus*, l'ameba manca di uroide, non vive appoggiata al substrato, ma sospesa nel mezzo colturale come l'*Amoeba proteus*, quando è a riposo, in buone condizioni. L'aspetto dell'endoplasma ricco di inclusi è da *Amoeba proteus*.

Ho osservato che blu di metilene aggiunto al liquido di coltura fa incistare l'*Amoeba spumosa*. Ma, nè spontaneamente negli allevamenti, nè trattando

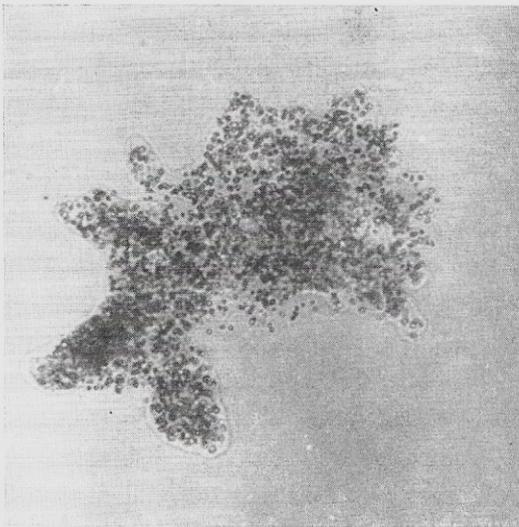


Fig. 9 - A. discoides Schaeffer ($\times 160$).

con blu di metilene è stato possibile veder incistare l'*Amoeba proteus*. Anche la Tylor dice che l'*Amoeba proteus* non è in grado di formare la parete cistica che invece i diversi stadi di *Amoeba spumosa* possono fare: nelle grandi amebe si ha solo la formazione di cisti endocellulari. L'*Amoeba* « tipo proteus » della Lombardia trattata con blu di metilene non forma parete cistica, manifestando così un altro carattere da *Amoeba proteus*. Purtroppo anche per queste forme c'è difficoltà di

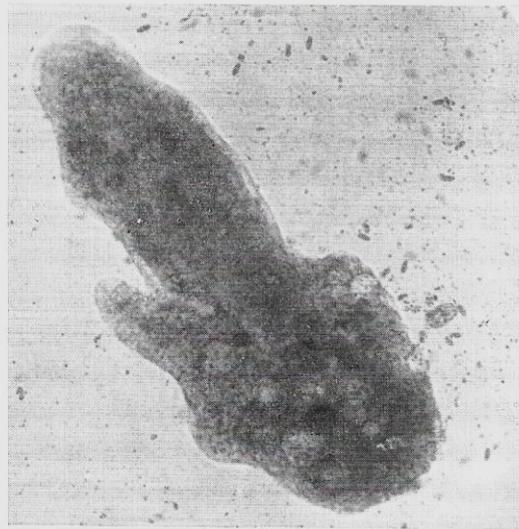


Fig. 10 - Chaos chaos Schaeffer ($\times 80$).

allevamento; si sono in qualche caso moltiplicate per scissione durante i primi giorni di coltura in laboratorio, ma non sono riuscite ancora ad ottenere un allevamento che andasse oltre un mese.

Non ho mai trovato negli ambienti presi in considerazione le grandi amebe polinucleate appartenenti alle specie *Chaos (Pelomyxa) chaos*, ma in vecchi registri di cattura dell'Istituto la trovo registrata.

Gli allevamenti di cui ora dispongo, sono: di *Amoeba spumosa*, di *Amoeba*

proteus, di *Amoeba discoides*, di *Chaos chaos*, di cui solo per l'*A. spumosa* mi è stato possibile ottenerli partendo da individui selvatici. È infatti facile mettere in allevamento l'*Amoeba spumosa* e conservarla (i più vecchi allevamenti che possiedo risalgono ormai a dieci anni). Le altre colture di cui ho parlato provengono: l'*Amoeba proteus* e la *Amoeba discoides* (Fig. 9) dalle colture del King's College di Londra, le *Chaos chaos* (Fig. 10) dalle colture di Schaeffer di Philadelphia.

È importante notare che il fenotipo dell'*Amoeba spumosa* da noi allevata si modifica notevolmente in rapporto a cambiamenti dei fattori ambientali. Questa ameba è allevata comunemente alla luce, in infuso di fieno a pH alcalino

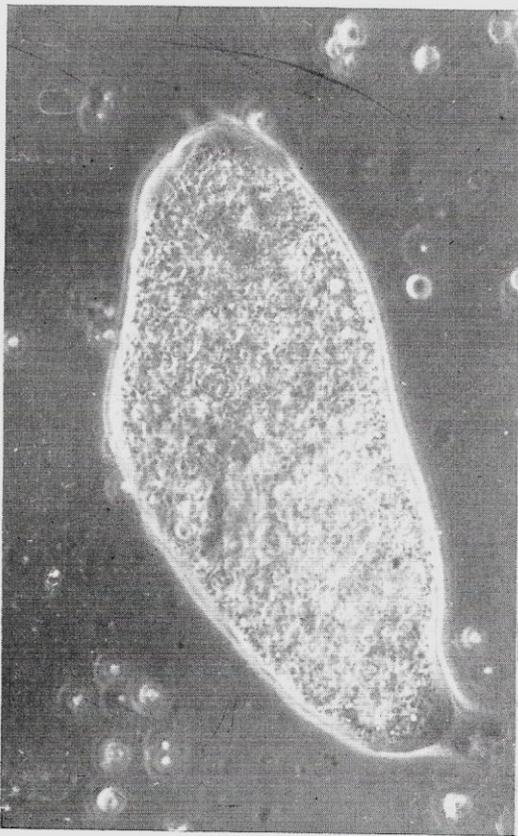


Fig. 11 - *A. spumosa* allevata al buio ($\times 600$).

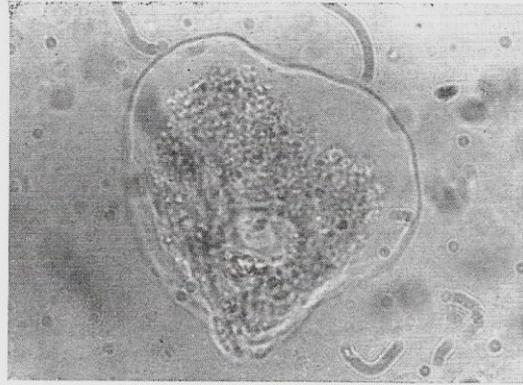


Fig. 12 - *Flabellula velata* ($\times 800$).

lino (è questa la condizione in cui si verifica la gametogenesi). È allevata in vetrini da orologio posti in camere umide, a temperatura ambiente. Se si cambia il metodo di coltura, se cioè si tengono le amebe al buio, nel liquido colturale di Chalkley con un granello di riso (metodo di allevamento comunemente consigliato e da me seguito per le *Amoeba proteus*) in poche settimane l'aspetto di queste amebe cambia notevolmente: non solo il loro protoplasma diviene più scuro (questo va messo in rapporto a una maggiore nutrizione che porta come conseguenza un maggior numero di inclusi citoplasmatici evidentemente in rapporto all'alimentazione) ma le amebe aumentano anche in dimensione, l'uroide scompare, presentano pseudopodi ridottissimi (Fig. 11) e, in qualche caso, non sono più aderenti al substrato, ma sospese nel liquido di coltura. Il rimarchevole modificarsi del fenotipo di queste amebe le porta ad assumere alcuni caratteri che contraddistinguono la *Amoeba proteus* e può ritenersi favorevole alla ipotesi che tutte le piccole forme e cioè l'*Amoeba spumosa*, l'*Amoeba vespertilio*, l'*Amoeba verrucosa* e la piccola *Amoeba* « tipo proteus » delle

acque dolci lombarde non rispondano ad altrettante specie, ma siano particolari aspetti di un'unica forma (¹).

Ripeto però che nell'ambiente naturale coesistono forme rispondenti alle varie specie e che ancora non ho in mano dati che mi permettono di risolvere il problema in forma definitiva.

È necessario a questo fine una ricerca dettagliata dei vari microambienti di una stessa raccolta di acqua ed è anche necessario avere ulteriori caratteri su cui basarsi affrontando lo studio dei nuclei della amebe al fine di determinare, se possibile, il corredo cromosomico delle varie forme, e precisare gli aspetti fenotipici del nucleo a riposo. Inoltre cerco ricorrere a caratteri sierologici con ricerche che già hanno dimostrato una differenza della superficie cellulare tra la forma *spumosa* e la forma *proteus*, differenza negli antigeni superficiali, che però già emerge dalla possibilità di incistarsi o meno.

(¹) Il fenotipo di queste amebe è certamente assai plasmabile, per es. trattando *Amoeba spumosa* con ribonucleoproteine estratte da un fitoflagellato (*Chlamydomonas*) dopo circa un mese dal ricupero delle amebe trattate si sono osservate nelle colture delle forme giganti. L'accrescimento abnorme concerneva essenzialmente il citoplasma (aumento del 200 % del citoplasma, del 50 % del nucleo) e si è protratto per circa ottanta generazioni. Si tratta evidentemente di « Dauermodifikation ».

Un'ultima osservazione viene fatta a proposito della forma descritta dagli autori come *Flabellula velata* (Fig. 12); amebe con aspetto descritto per questa specie, cioè a ventaglio, con granulazioni ammassate all'apice del ventaglio e il resto del citoplasma fortemente ialino rispondono a stati di sofferenza delle amebe. Le amebe con questo aspetto non si moltiplicano e vanno incontro a degenerazione.

Per concludere, i risultati delle ricerche mie e dei mie collaboratori sono per ora questi: sono stati individuati i meccanismi di riproduzione delle amebe di acqua dolce, studiando la specie *Amoeba spumosa*. Si è puntualizzata la inesistenza dell'*A. limax* e dell'*A. radiosa* come specie; esse sono forme di transizione che appaiono nel ciclo biologico dell'*Amoeba spumosa* e che molte amebe possono assumere in determinati momenti. Si nega inoltre la specie *Flabellula velata*, interpretandola come forma di degenerazione.

Per le amebe di piccole dimensioni che si trovano nell'ambiente naturale, che non si è ancora riusciti ad allevare con i comuni metodi di coltura delle *Amoeba spumosa* e *Amoeba proteus*, resta aperto il problema se si tratta realmente di specie o di razze originatesi per mutazioni, o se il loro particolare fenotipo è semplicemente legato a dei fattori ambientali.