





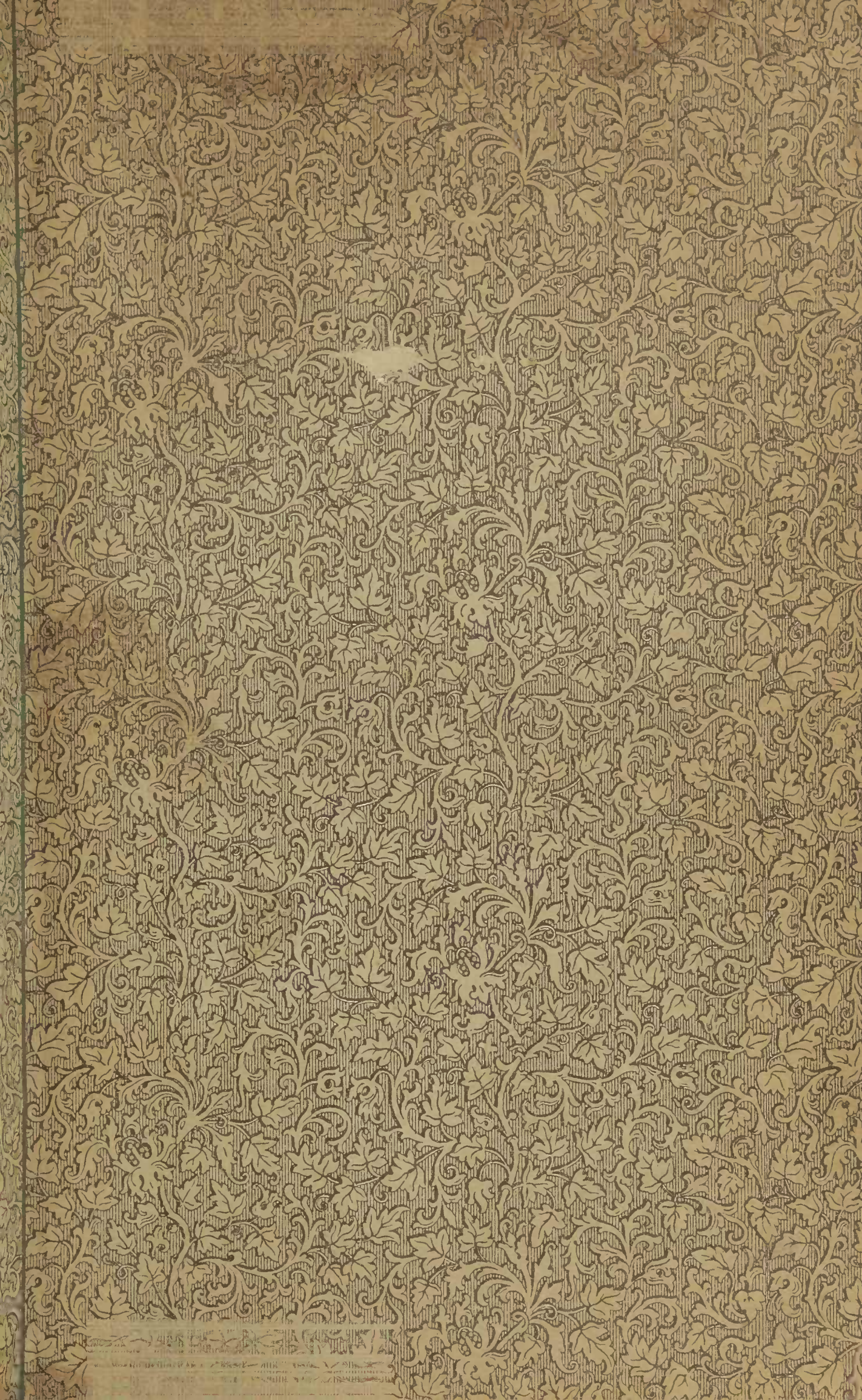
10.528

DEDALUS - Acervo - FM



10700059110

45998





**MANUALE**  
**DI**  
**TECNICA MICROSCOPICA**



**Dr. DAVIDE CARAZZI**  
Professore pareggiato di Zoologia nella Regia Università di Napoli

---

**MANUALE**  
DI  
**TECNICA MICROSCOPICA**

GUIDA PRATICA PER LE RICERCHE

DI

**CITOLOGIA E ISTOLOGIA ANIMALE**

CON UNA APPENDICE DI

**Tecnica Batteriologica e d'Istologia Patologica**

---

  
Con 52 figure nel testo  


MILANO  
SOCIETÀ EDITRICE LIBRARIA  
*Via Disciplini, 15*

1899

10-1-55 "  
"C. Priere"  
doação

578  
C/76m



## PREFAZIONE



Spero d'aver fatto un Manuale che serva veramente di guida pratica a chi vuole impararè la tecnica microscopica; quindi, mentre mi sono indugiato, anche a costo di diventar prolisso, su quei punti che reputavo di molta importanza, ho appena accennato od anche omesso del tutto quel che mi pareva di poco conto, cercando di fare sempre una scelta accurata.

Non mi faccio illusioni, e sono persuaso che il mio lavoro sarà tutt'altro che privo di difetti, ma spero che allo studioso possa giovare più di tanti Trattati che vanno per la maggiore e che hanno avuto l'onore di traduzioni. Libri voluminosi, ricchi di metodi e di formule, ma che (secondo il mio modo di vedere) non sono fatti criticamente; e, mentre non spiegano con abbastanza chiarezza e precisione quel che più importa far conoscere, confondono il principiante, presentandogli, con poca scelta, grande quantità di materiale, spesso privo di valore.

Certo è molto difficile fare un buon libro di Tecnica microscopica, perchè essa è quasi del tutto empirica, ben lontana ancora dal diventare (come spera l'Apáthy) una scienza. A questo ideale si potrà avvicinare sol quando gli istologi saranno anche dei chimici provetti; invece, novecentonovantanove volte su mille, essi non si curano neanche di vedere se l'acqua e l'alcool che adoperano sono neutri, o a reazione acida od alcalina. Chi scrive un libro di Tecnica microscopica dovrebbe poi essere non soltanto un istologo e un chimico capace, ma aver anche lavorato per anni ed anni al solo scopo di controllare i metodi degli altri. Talchè forse, a cercar bene, oggidì in tutto il mondo scientifico

non si troverebbero che due persone capaci di compire un così difficile lavoro: Paul Mayer e Stefano Apáthy, tutti e due tanto benemeriti della tecnica istologica. Ma il primo, forse per soverchia modestia, invece di darci un libro suo, si è limitato a tradurre, pur migliorandolo, un mediocre Trattato inglese. Il secondo ha bensì cominciato, sono ormai tre anni, la sua *Mikrotechnik der Thierischen Morphologie* <sup>1)</sup>, ma ancora deve uscire la seconda parte, ed è lontano il giorno nel quale avremo l'opera completa. Tuttavia raccomando caldamente allo studioso la lettura del libro del prof. Apáthy, conoscitore profondo della tecnica, lavoratore accurato e indefesso.

Chi vuol mettersi al corrente di tutte le novità della Tecnica microscopica, non soltanto animale, ma anche vegetale, batteriologica e petrografica, deve leggere la *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie* <sup>2)</sup>, della quale esce ogni anno, dal 1884, un volume in quattro fascicoli.

Ho creduto utile aggiungere al Manuale una breve appendice di tecnica batteriologica (scritta dal collega dott. Silvio Dessy), per quanto l'argomento uscisse dai limiti che mi sono imposto. Inutile dire che chi vuole approfondirsi in questa parte della tecnica dovrà ricorrere ai libri che ne trattano di proposito.

Nel capitolo XXV, *Metodi di ricerca degli animali inferiori*, non mi sono trattenuto a descrivere la preparazione *in toto* dei grossi animali, ed ho appena accennato alle operazioni preliminari occorrenti per averli in estensione ed in buon stato di conservazione. Per questa parte, che si riferisce piuttosto alla tecnica zootomica, rimando il lettore all'interessante lavoro del dott. Lo Bianco: *Metodi in uso alla Stazione zoologica di Napoli per la conservazione degli animali marini* <sup>3)</sup>.

Nelle citazioni mi sono limitato alle recentissime, mettendo in nota l'indicazione bibliografica; e qui ricordo che il numero seguito da un punto, scritto subito dopo il titolo del periodico, indica il volume, vengono in seguito l'anno e la pagina. Per le citazioni degli ultimi anni, ma precedenti il 1896, ho messo nel testo soltanto l'anno di pubblicazione dopo il nome dell'autore; in

---

<sup>1)</sup> Braunschweig, H. Bruhn ed., 1896.

<sup>2)</sup> Idem, ibidem.

<sup>3)</sup> In *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 9. 1890, pag. 435.

---

questo modo basterà consultare l'ottimo *Zoologischer Jahresbericht*<sup>1)</sup> di quell'anno per trovare l'indicazione bibliografica completa.

Prima di finire prego il lettore di non considerare il mio Manuale soltanto come un formulario (per quanto in parte un formulario sia, nè poteva non esserlo), ma come un libro che deve esser letto tutto prima di venir giudicato.

Al lettore paziente e cortese sarò poi molto obbligato se vorrà farmi conoscere le mende e le sviste nelle quali sono certamente incorso.

*Napoli, Stazione zoologica, luglio 1899.*

**D. C.**

---

<sup>1)</sup> Berlin, Friedlaender e Sohn. Il *Zool. Jahresb.* comincia dal 1879.





# INDICE DEI CAPITOLI

---

PREFAZIONE

pag. v

## PARTE PRIMA

### Tecnica generale.

CAPITOLO		pag.
	I. — Come si lavora al microscopio	3
»	II. — Fissazione dei tessuti	23
	Altre formule di fissativi	37
»	III. — Indurimento	» 40
»	IV. — Colorazione. Colori del carminio e dell'ematoxilina	42
»	V. — Colorazione. Colori di anilina	50
	a) Colori basici	53
	b) Colori acidi	56
»	VI. — Colorazioni doppie e triple	» 57
	VII. — Colorazione. Colori metallici. Impregnazione	62
	VIII. — Disidratazione e rischiaramento	66
	IX. — Rivestimento dei pezzi	70
»	X. — Modo di fare le sezioni. Coltelli e microtomi	81
»	XI. — Come si attaccano le sezioni e come si trattano successivamente	106
»	XII. — Liquidi conservativi e così detti indifferenti. Vernici e resine	» 115
	XIII. — Corrosione, decalcificazione, desilicificazione, imbianchimento	123
»	XIV. — Preparazioni ed osservazioni diverse	125
»	XV. — Orientamento di oggetti difficili e ricostruzione delle sezioni	134
	XVI. — Conservazione e collezione di preparati	144
	XVII. — Laboratorio e suo arredamento	149
»	XVIII. — Il microscopio composto, i suoi accessori e gli altri strumenti ottici	153
»	XIX. — Materiale necessario nel laboratorio	176
»	XX. — Reagenti	184

## PARTE SECONDA

**Tecnica speciale**

CAPITOLO XXI. — Metodi citologici	pag. 193
Studio del sangue	» 198
Studio degli spermatozoi	204
I protozoari	206
XXII. — Embriologia dei metazoi	» 210
Embriologia dei celenterati	211
Embriologia dei vermi	ivi
Embriologia degli artropodi	» 216
Embriologia dei molluschi	» 220
Embriologia dei tunicati	» 222
Embriologia dei vertebrati	ivi
» XXIII. — Metodi istologici. Tessuti ed organi	» 230
Gli epiteli	» ivi
I tessuti connettivi	» 234
Il tessuto muscolare e le terminazioni nervose motrici	237
» XXIV — Sistema nervoso centrale e periferico; gli organi dei sensi	239
Il metodo Golgi dell'impregnazione nera	» 242
Metodi Weigert, Pal, Marchi	250
Metodi al blu di metilene	» 259
I metodi citologici	261
Gli organi dei sensi	» 267
XXV — Preparazione di animali inferiori per le ricerche istologiche	270
APPENDICE. — Tecnica batteriologica e d'istologia patologica	280
Metodi speciali	283
Esame dei tessuti	287
Ricerca dei microrganismi nei tessuti	» 293
AGGIUNTE E CORREZIONI	297
INDICE ALFABETICO	299

## INDICE DELLE FIGURE

---

1. Apparecchio verticale per microfotografia, modello del prof. Ruffini, costruzione Koristka	6
2. Prisma Nachet	8
3. Camera chiara Abbe, modello 1894	9
4. Camera chiara Abbe	10
5. Tavoletta Bernhard (modello Zeiss) per disegnare	12
6. Una forma del Leuckhart	78
7. Cuoio da affilare, montato su di un sostegno di legno (modello Zimmer)	83
8. Sezione schematica del coltello	84
9. Coltello da microtomo in sezione	85
10. Sezione schematica di un microtomo a slitta e ad innalzamento diretto	87
11. Sezione schematica di un microtomo a slitta	ivi
12. Microtomo Becker	92
13. Vite micrometrica del Becker	93
14. La stessa, dopo rovesciata	ivi
15. Interno del tamburo <i>d e</i> della vite micrometrica a rovesciamento	ivi
16. Microtomo a slitta Thoma-Jung, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli	94
17. Portacoltello del microtomo Thoma-Jung	95
18. Coltello per il microtomo Thoma-Jung	96
19. Manico in legno, con vite, per affilare il coltello della fig. 18	ivi
20. Posizione orizzontale del coltello	98
21. Posizione inclinata del coltello sul blocco	ivi
22. Microtomo a bilico, Cambridge-Jung, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli	100
23. Portaoggetti del microtomo a bilico, Cambridge-Jung	101
24. Microtomo a leva di J. G. de Groot	105
25. Tubo di vetro con coperchio a cappello	112
26. Tubo di vetro con coperchio a disco	ivi
27. Vasetto per la resina, visto in sezione	121
28. Vasetto per la resina, secondo il modello di Fol	ivi
29. Sezione di una piccola saliera di vetro	128
30. Portaoggetti con una porzione della superficie smerigliata	145
31. Scatola di cartone per 20 preparati	147
32. Cassetta per trasportare i preparati	148
33. Scatoletta per trasportare i preparati	ivi

---

34. Il microscopio composto	153
35. Stativo, modello grande III del Koristka	155
36. Apparato d'illuminazione Abbe, con diaframma iride e specchio	157
37. Il diaframma iride isolato	158
38. Sezione dell'oculare compensatore n. 12	159
39. Sezione dell'obiettivo apocromatico 2 mm. ad immersione omogenea	ivi
40. Revolver per tre obiettivi	165
41. Tavolino traslatore, da applicarsi ai grandi modelli	166
42. Illuminatore verticale	167
43. Lente aplanatica perfezionata; a destra è vista in sezione	170
44. Sostegno snodato, con lente aplanatica	ivi
45. Lente Brücke con sostegno semplice	171
46. Microscopio semplice del Mayer	172
47. Microscopio binoculare da dissezione secondo Greenough, e con sostegno mobile in tutte le direzioni, di Braus e Drüner.	173
48. Stufa da paraffina, modello Stazione Zoologica di Napoli	177
49. Schermo per riparare l'occhio durante l'osservazione al microscopio	178
50. Termoregolatore Reichert	ivi
51. Modello di bottiglia con tappo piano superiormente	181
52. Bottiglietta con tappo contagocce	ivi

---



PARTE PRIMA  
**TECNICA GENERALE**





## CAPITOLO I.

### Come si lavora al microscopio



**1. Generalità.** — Nei capitoli che seguono vedremo con quali norme si fanno i preparati microscopici; non sarà inutile premettere in questo qualche indicazione pratica sul modo di trarne partito osservandoli e studiandoli.

Il microscopista deve avere prima di tutto alcune qualità, senza delle quali non potrà riuscire a niente, e che d'altra parte devono essere possedute da tutti quelli che si vogliono dedicare alle scienze sperimentali: esse non si possono acquistare, ma soltanto sviluppare coll'esercizio. Chi non le possiede potrà lavorare quanto vuole, ma non riuscirà a mettere insieme niente di buono, tutt'al più aumenterà di qualche volume la nostra zavorra scientifica.

Queste qualità sono: una discreta dose d'ingegno naturale, di spirito d'osservazione, di pazienza, di ordine ed una certa attitudine meccanica. Coll'esercizio assiduo egli potrà dopo qualche anno di lavoro impadronirsi della tecnica microscopica, e tanto più facilmente quanto più presto avrà cominciato. Volendo allora dedicarsi alle ricerche di istologia, egli dovrà acquistare anche una larga coltura generale di tutta la materia e non soltanto della parte speciale alla quale ha intenzione di dedicarsi. Una buona conoscenza della istologia generale, come fondamento; lo studio assiduo dei lavori più importanti che si riferiscono ai problemi generali della materia, la lettura continua di tutte le pubblicazioni speciali che svolgono argomenti affini a quello che si vuol trattare: ecco come impiegare tutto il tempo che non è dato al lavoro microscopico. Chi crede di poter fare dell'istologia, poniamo, dell'apparato digerente degli anfibi senza conoscere, oltre all'istologia generale, anche i lavori principali che trattano dell'apparato digerente negli altri animali; chi vuole studiare la cariocinesi in un dato organo senza conoscere quello ch'è stato

fatto sull'argomento non solo nel campo della citologia animale, ma anche in quella vegetale, farà certo opera meschina e monca, spesso anche errata <sup>1)</sup>).

Sull'importanza della tecnica per lo studio dell'istologia non credo sia necessario insistere e rimando a quel poco che ho detto nell'introduzione. Certamente su dieci errori d'istologia la metà sarà da attribuirsi ad incapacità dell'osservatore, ma l'altra metà è dovuta a insufficienza tecnica. Non basta dunque lavorare molto, bisogna cercare di lavorar bene; e per questo bisogna essere ordinati, puliti e precisi.

Un buon preparato vale più di mille cattivi. E per fare un preparato buono non ci vuole nè più tempo, nè molta più abilità di quanto occorra per farne uno cattivo: basta soltanto maggiore accuratezza e precisione. Nessuna fretta, nessuna dimenticanza, tener sempre nota di tutto, non preparare e non portare avanti troppo materiale in una volta, non aver troppa carne al fuoco; dare a tutte le diverse manipolazioni, anche le più insignificanti, la stessa attenzione che si dà alle più difficili: ecco alcune norme che dovrebbero essere sempre presenti alla memoria.

**2. Orario dell'istologo.** — Chi ha poco tempo disponibile, chi non può consacrare diverse ore di seguito, non interrotte da altre occupazioni, al lavoro d'istologia, è meglio che tralasci questo studio. Il tempo che esige la tecnica è sempre rilevante, perchè, di solito, le diverse operazioni non possono essere sospese e rimandate; l'osservazione al microscopio esige di per sè un tempo lungo, perchè essa non dà frutti se non è continuata, e molto spesso deve essere accompagnata da appunti e da disegni. È quindi necessario aver libera almeno una mezza giornata di seguito. Ed è ovvio, in questo caso, che si dovrà preferire la mattina al pomeriggio; e soprattutto il giorno alla sera. Da noi le giornate chiare e lunghe sono tante, che credo proprio inutile voler fare dell'istologia con luce artificiale. Non che non si possa lavorar bene al microscopio anche con quella: specialmente quando si ricorra alla lampadina elettrica

---

<sup>1)</sup> Per la coltura generale d'istologia e di citologia sono da consigliare come prima lettura: HERTWIG O., *Zelle und Gewebe* (2 vol.; il primo del 1892, già tradotto in francese, il secondo è del 1898), e WILSON E., *The Cell in development and Inheritance*, New-York e London, Macmillan, 1896. Questo è certamente il più bel libro che sia stato scritto sull'argomento.

Meritano di esser letti attentamente, specialmente per lo studio chimico della cellula, il vecchio lavoro del CARNOY, *La biologic cellulaire*, 1884, e le due pubblicazioni recenti di CARNOY e LEBRUN, *La vésicule germinative et les globules polaires chez les Batraciens*, *La Cellule*, t. XII, 1897, pag. 191, e *La fécondation chez l'« Ascaris megalocephala »*, idem, t. XIII, 1898, pag. 63. Inferiore ai due libri più sopra citati è il voluminoso libro dell'HENNEGUY.

ad incandescenza messa direttamente sotto al condensatore Abbe; ma è meglio riservare le ore oscure alla lettura e allo studio, consacrando quelle del giorno alla ricerca.

**3. Luce per il microscopio.** — Ho detto che è meglio preferire quella del giorno a quella artificiale, eccetto quando non si possa fare diversamente, nel qual caso la migliore sorgente luminosa sarebbe quella elettrica. Non potendola avere si potrà ricorrere al gas e si prestano benissimo i becchi colla reticella AUER, o al petrolio, ed allora s'interporrà fra la sorgente luminosa e lo specchio del microscopio un matraccio sferico pieno di una soluzione blu che si può ottenere facilmente mettendo nell'acqua, con un poco d'ammoniaca, del solfato di rame. In tal maniera arriva alla preparazione una luce dolce, che non stanca durante l'osservazione. Se si dispone di una lampadina elettrica, si potrà mettere un disco di vetro colorato in blu sopra la lente dell'apparato Abbe, a livello del tavolino del microscopio <sup>1)</sup>.

Quanto alla luce del giorno è detto, descrivendo il laboratorio (capitolo XVII), che non deve mai giungere allo specchio del microscopio il raggio diretto del sole: ma bensì vi si deve riflettere la luce diffusa. Può darsi tuttavia che, specialmente nell'estate, questa sia tanta da non permettere una buona osservazione e da stancare la vista; si potrà allora ricorrere ad una semplice tendina bianca.

Ma ad ogni modo quando si fanno delle osservazioni prolungate coll'obiettivo ad immersione e quando si deve disegnare, bisognerà riparare l'occhio dalla soverchia luce che gli arriva dal tratto compreso fra l'orbita e l'orlo dell'oculare, luce che disturba molto, come quella che lascia vedere meno bene dentro al microscopio. Per un po' di tempo un rimedio semplicissimo si ha facendosi schermo con una mano, ma in questo modo ne rimane una sola di libera. Altri schermi si possono fare o col far reggere al tubo stesso del microscopio, mediante un filo metallico, un rettangolo di cartone nero incurvato che intercetta i raggi appunto nel tratto voluto. Si può anche con un comune sostegno di ferro, come quelli che si usano nei laboratori, reggere verticalmente un pezzo di cartone, che si avvicina o si allontana a volontà. Finalmente, quando proprio interessasse stare quasi all'oscuro, si può mettere davanti al microscopio un grande schermo, fatto con del cartone nero incurvato che toglie tutta la luce che viene dalla finestra, e nella parte inferiore di esso tagliare una piccola apertura quadrata per lasciar passare i raggi luminosi, che saranno raccolti dallo specchio.

---

<sup>1)</sup> Ingegnoso e semplice è anche il modo d'illuminazione che ho indicato nel mio *Manuale elementare di tecnica di anatomia microscopica*, Milano, 1894, pag. 28.

**4. Microfotografia.** — Ha preso molto sviluppo in questi ultimi anni, specialmente dopo che furono inventati apparecchi molto più semplici e meno costosi di quelli ch'erano usati un tempo. E fra questi merita essere menzionato quello ideato dal prof. RUFFINI e costruito dal KORISTKA <sup>1)</sup>, che può venire adoperato verticalmente, anche servendosi della luce solare, e che costa soltanto 75 lire.

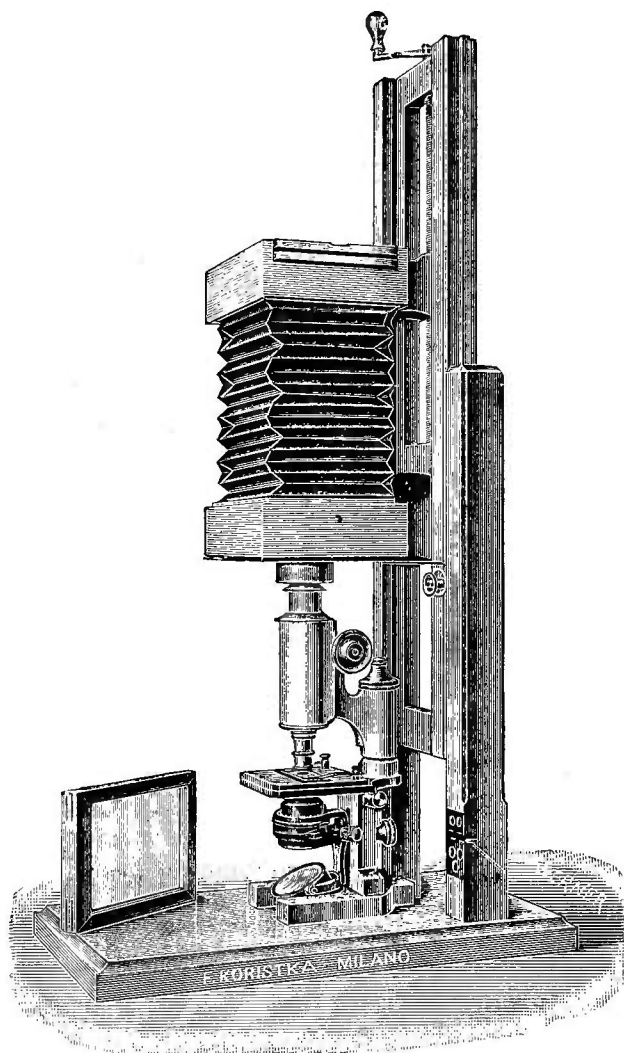


Fig. 1. — Apparecchio verticale per microfotografia, modello del prof. RUFFINI, costruzione KORISTKA,  $\frac{1}{9}$  del vero.

non può darci quel che ci occorre. E la ragione ne è semplicissima: la fotografia ci dà un dato piano, nè più nè meno, oppure con dei più e dei meno che non sono certo comodi per l'osservazione, cioè con delle ombre e con degli scuri, che tolgono chiarezza ad un particolare, che per lo scopo che ci proponiamo può essere importantissimo; e con dei tratti sfumati o appena accennati là dove

Il vantaggio di poter avere delle microfotografie di preparati microscopici sarebbe senza dubbio grandissimo; resterebbe in questo modo escluso del tutto il dubbio, spesso fondato, che si ha nell'esaminare i disegni, cioè ch'essi non corrispondano proprio alla realtà. Ma, disgraziatamente, non si può dire che finora la microfotografia, salvo alcuni casi speciali, abbia dato quel che se ne aspettava; ed è probabile, io oserei dire certo, che non lo darà mai. A parte le difficoltà tecniche d'una buona riproduzione fotografica di preparati microscopici a fortissimo ingrandimento, difficoltà che potranno essere, ma ancora non sono state superate; e per convincersene basta aver avuto sott'occhio quelle mediocrissime fotografie colle quali il BÜTSCHLI prima, ed appena ieri l'ERLANGER, vollero per-

suaderci della struttura alveolare del protoplasma; sta in fatto che la microfotografia

<sup>1)</sup> Vedi *Monitore zoologico italiano*, 8, 1897, pag. 170.

a noi interesserebbe vedere con precisione. D'altronde non è con un solo piano ottico che noi possiamo vedere tutto quello che ha d'interessante un preparato. Infatti durante l'osservazione noi dobbiamo di continuo fare dei movimenti colla vite micrometrica, per riuscire a veder bene; ed anche di una piccolissima parte di un elemento, di un centrosoma, per esempio, o di un nucleolo, noi non ci saremo fatto un'idea chiara e precisa, non potremo dire di aver visto tutto quel che c'è da vedere, se non esaminando piani diversi. Ora tutto ciò non si può sperarlo mai dalla fotografia <sup>1)</sup>.

Dobbiamo finalmente aggiungere che anche quando si riesce a vincere tutte le difficoltà e ad ottenere delle buone negative, queste sono sciupate quasi sempre dalla riproduzione in fototipia.

**5. Disegni di oggetti microscopici.** — Mettersi in grado di riprodurre col disegno un preparato che c'interessa è senza dubbio utile ed importante; ma non si deve dimenticare che il disegno è un accessorio, un complemento del lavoro microscopico, e non già la parte principale. Beninteso che fanno eccezione quei casi che si danno in zoologia, e nei quali si tratta di descrizione di forme microscopiche; allora è ovvio che il disegno costituisce la parte più importante del lavoro, e che il testo non ha altro scopo che di illustrare le figure. Ma quando si tratta d'istologia e di citologia dev'essere precisamente l'opposto, ed i disegni dovrebbero essere fatti per spiegare il testo, non questo quelli. Oggidi pur troppo non di rado s'intendono le cose alla rovescia, perchè è invalsa l'abitudine di giudicare del valore di una pubblicazione dalla mole di esso e dalla bellezza delle tavole; e così più d'uno, piuttosto di affaticarsi a lavorare per diventare istologo provetto, trova più comodo e più semplice diventare un buon disegnatore. Cosa utile, senza dubbio, ma che evidentemente è molto diversa e molto lontana dalla scienza.

Quanti meschini e insufficienti preparati microscopici furono i colpevoli genitori di splendidi disegni, nei quali si scorgevano tante cose che l'occhio più linceo non sarebbe riuscito a vedere nel preparato! Esclusa la mala fede, io credo che di un micrografo troppo abile disegnatore c'è sempre da dubitare, e che sia preferibile essere piuttosto bravo micrografo e mediocre artista. Possedere in grado eminente le due qualità non si può, perchè esse raramente s'accor-

---

<sup>1)</sup> Già, a voler esser giusti, all'infuori dell'esattezza di un contorno, la quale d'altro canto può essere ottenuta meccanicamente senza di essa, la fotografia ha dato meschini risultati anche applicata agli oggetti macroscopici di storia naturale. Essa è stata molto adoperata, per esempio, nella riproduzione dei fossili, ma anche qui si va incontro ai soliti inconvenienti: un particolare importantissimo, che il disegno metterebbe in evidenza, resta del tutto nascosto, a cagione di un'ombra, nella fotografia.

dano. Il buon micrografo è sempre preciso, esatto, di scarsa fantasia, di molto acume critico. Il buon disegnatore ha invece un temperamento artistico, cioè l'opposto del primo.

Ciò premesso, ripeto che è importante mettersi in grado di disegnare da sè i propri preparati microscopici, perchè nel maggior numero dei casi il disegno dell'osservatore potrà essere difficilmente fatto dall'artista di professione. Meglio, secondo me, mediocri disegni fatti dallo stesso microscopista, che non dei disegni belli fatti da un altro. E disegnare al microscopio, se si tratta di pura istologia e di citologia, non vuol dire poi fare dei paesaggi o dei ritratti; ma semplicemente riprodurre quel che si vede in un piano. Non è quindi necessario, come tanti credono, avere una dispo-

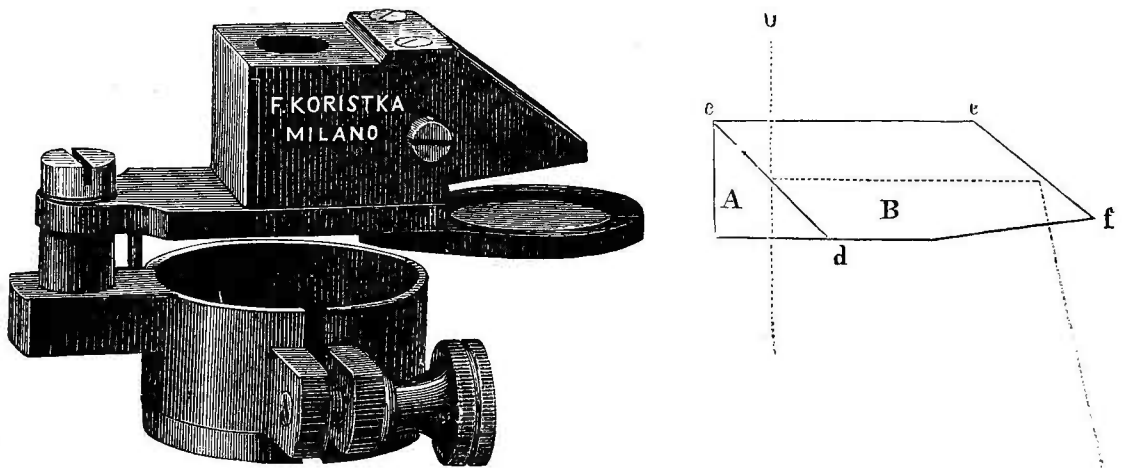


Fig. 2. — Prisma NACHET, grandezza naturale.

sizione speciale per il disegno: basta della pazienza per riuscire. Un aiuto, che ci assicura anche della precisione dei contorni e delle dimensioni, noi l'abbiamo negli apparecchi *ad hoc* che si applicano al microscopio e dei quali i più adoperati sono: il prisma di NACHET, la camera chiara di OBERHAÜSER e la camera chiara dell'ABBE.

**6. Prisma di Nachet.** — È un prisma con una faccia dorata e trasparente; lo straterello d'oro lascia passare l'immagine data dall'oculare nello stesso tempo che riflette nell'occhio l'immagine della carta e della punta del lapis: di modo che vedendo contemporaneamente queste e quella noi possiamo disegnare il contorno esatto ed anche i particolari più vistosi della sezione che abbiamo nel campo del microscopio. Il costo di questo apparecchio è basso (KORISTKA lo dà per L. 35) ed il suo uso semplicissimo. La figura stessa fa vedere come esso si adatta al tubo del microscopio, e come possa essere facilmente allontanato dalla lente superiore dell'oculare, quando si voglia continuare l'osservazione senza servirsi del prisma. La lente colorata che sta a destra ha lo scopo di diminuire la luce quando questa è troppa. Dirò più sotto del modo di servirsene.



Tralasciando di parlare della camera di Oberhäuser, ormai poco usata, consiglio l'ultimo apparecchio modificato dall'ABBE, che è certamente la migliore camera chiara che abbiamo. Essa può venire applicata tanto al microscopio semplice che a quello composto. Si tenga nota che di questa camera vi sono due altri modelli più vecchi e più semplici, ed anche meno costosi. Questo che io descrivo è il più moderno (1894) ed il più perfetto. Viene costruito dallo ZEISS di Jena, ma credo che si possa avere anche dal KORISTKA di Milano.

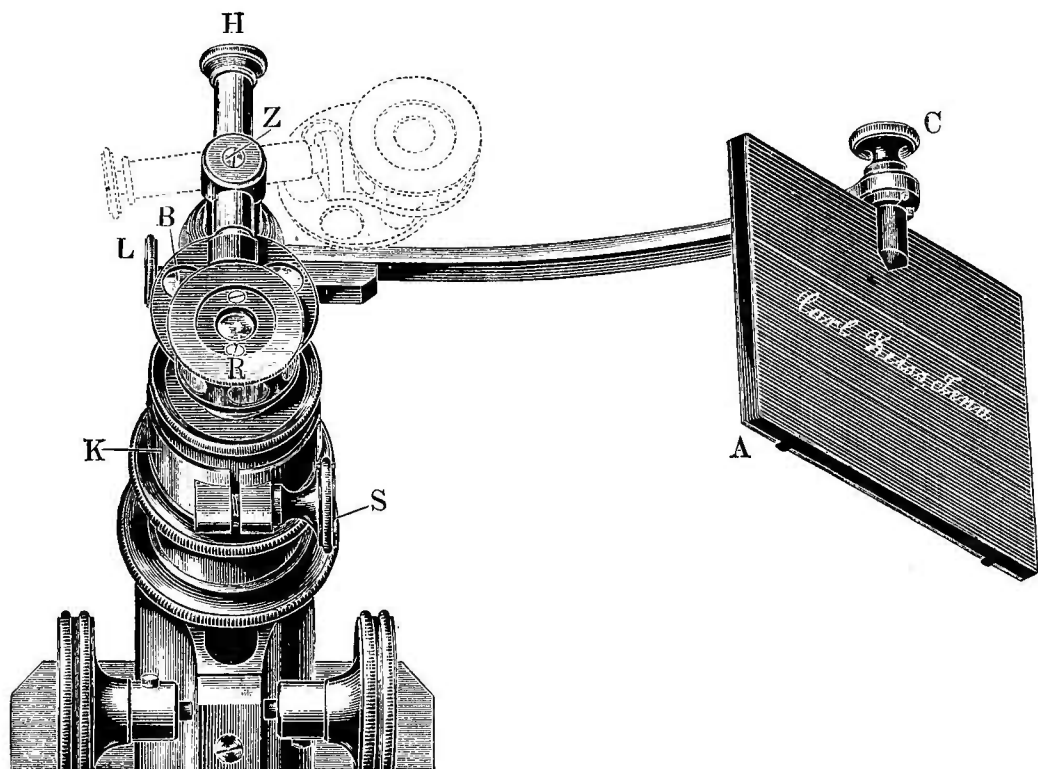


Fig. 3. — Camera chiara ABBE, modello 1894.

**7. Camera chiara Abbe (modello 1894).** — Le figure permettono di abbreviare la descrizione. Col mezzo del cerchio *K*, stretto dalla vite *S*, la camera si fissa al tubo del microscopio; con le due viti *L* ed *H* si può centrare l'apparecchio, dal quale si riceve l'immagine del preparato e della punta del lapis; quest'ultima viene riflessa dallo specchio *A*, e quindi, per mezzo di una riflessione totale, di un piccolo prisma posto sull'asse della visuale, è portata all'occhio dell'osservatore. L'immagine microscopica si vede direttamente grazie ad un piccolo foro fatto nella superficie inargentata di un secondo prisma addossato al primo, in modo da formare un piccolo cubo. È questo che costituisce la parte essenziale dell'apparecchio e che si trova nell'interno del pezzo *P* della figura 4. Questo pezzo può venire cambiato con un altro, che ha il forellino della superficie inargentata più piccolo, e che deve essere impiegato quando si osserva con forti ingrandimenti, mentre il pezzo con il foro più grande viene

adoperato con gli obiettivi deboli. Il pezzo *P* penetra à *coulisse* nel piano centrale dell'apparecchio, sotto al quale sta il disco *B* provvisto di tanti fori che portano un vetro più o meno colorato. Lo scopo di questi vetri è di moderare l'intensità del fascio luminoso che proviene dal microscopio. Un tubo cilindrico *R* si sovrappone al pezzo *P*, intorno al quale può girare e così presentare al fascio luminoso, che proviene orizzontalmente dallo specchio, uno o l'altro dei fori, riparati anche questi da vetri più o meno anneriti. Col tamburo *R* e col disco *B* si può regolare a volontà la quantità di luce che arriva all'occhio, sia dal microscopio che dallo specchio, ossia dalla carta di disegno. Il piccolo apparecchio è mobile intorno

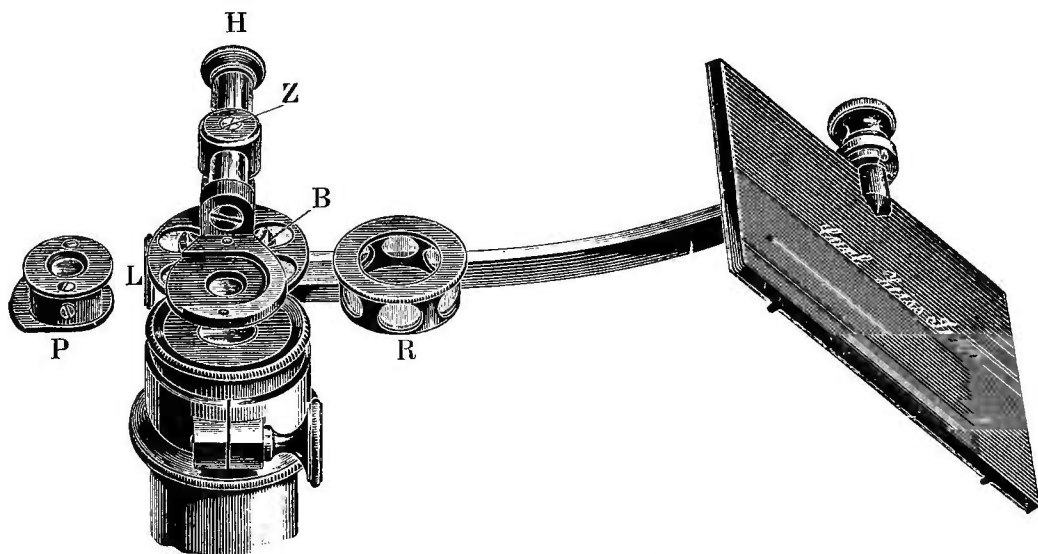


Fig. 4. — Camera chiara ABBE.

Il pezzo *P* (che porta il cubo fatto dai due prismi) ed il tamburo *R* sono stati levati.

all'asse *Z*, così che si può osservare senza camera chiara e senza che ci sia bisogno di levarla dal microscopio. Un arresto, che non si vede, fa sì che l'apparecchio torni esattamente allo stesso punto quando lo si rimette sull'oculare.

Un inconveniente noioso, al quale il fabbricante non ha ancora riparato, è questo: quando l'apparecchio è tolto dall'oculare e messo nella posizione segnata nella figura punteggiata, esso non ha un punto d'arresto, di modo che viene a battere sul naso dell'osservatore.

Ad oltre un decimetro di distanza si trova lo specchio piano, sostenuto da un gambo orizzontale che lo unisce all'apparecchio. Lo specchio è inclinato di un angolo di  $45^\circ$ , ma la sua posizione può essere modificata. Il costo di questa camera è di lire 75 (catalogo ZEISS).

**8. Come si disegna con la camera chiara.** — Quando si dispone del prisma di NACHET, bisogna provvedersi di una tavoletta incli-

nata dall'alto al basso e da destra verso sinistra accanto al microscopio; l'angolo d'inclinazione sarà di circa  $25^\circ$  sull'orizzontale. Questo è necessario, perchè altrimenti si otterrebbero delle immagini deformate. Non si possono suggerire indicazioni precise quanto all'altezza da dare alla tavoletta; ma in generale si può dire che essa sarà vicina al piano del tavolino del microscopio, o più bassa. Il livello preciso al quale l'osservatore trova che la punta del lapis si vede distintamente sulla carta, verrà determinato caso per caso, dipendendo dalla sua vista. Per moderare la luce che viene dallo specchio del microscopio si potrà stringere il diaframma ad iride; per quella che viene dalla carta da disegno ci sono le lenti affumicate. Ma questi due mezzi non sono sempre sufficienti per dare quella gradazione di luce necessaria per avere contemporaneamente visibile l'immagine e la punta del lapis; e per quanto la pazienza e l'esercizio possano aiutare, io consiglio, malgrado la maggiore spesa, di dare la preferenza alla camera chiara ABBE.

Con questa la tavola da disegno sarà tenuta orizzontale, purchè lo specchio sia lasciato nella sua posizione normale, cioè a  $45^\circ$ ; e l'altezza della tavoletta sarà approssimativamente quella del tavolino del microscopio. Facendo girare il tamburo *R* ed il disco *B* si regolerà a volontà la luce; se il disegno viene fatto a piccolo ingrandimento, si adopererà il cubo coll'apertura della superficie inargentata maggiore (2 mm.), ma con i forti ingrandimenti si dovrà adoperare quello col foro di 1 solo mm. Le persone affette da forte miopia potranno mettere una piccola lente divergente sopra il tamburo *R*.

**9. Tavoletta Bernhard.** — Questo tavolo ingegnoso è articolato in modo da poter alzare ed abbassare a volontà il piano dove si ferma la carta da disegno, da inclinare il piano stesso verso il microscopio e da poterlo avvicinare o allontanare. Infine tanto il microscopio che il piano possono essere inclinati della quantità voluta verso l'osservatore. Nel catalogo ZEISS il prezzo del tavolo è di L. 52.50 in oro (fig. 5).

Per la sua altezza questa tavoletta non può essere collocata su di un tavolo ordinario, a meno di servirsi di una sedia altissima; quindi è da consigliare il tavolinetto del quale sarà parlato al cap. XVII.

**10. Come si adopera la camera chiara.** — La camera chiara non può dar sempre il modo di disegnare *tutto* quello che si vede nel preparato; ma permette di fare i contorni e di segnare esattamente quel che c'è di più notevole. Si è così sicuri della proporzione e della esatta posizione delle diverse parti; ma anche questo è un grande vantaggio, che facilita molto il lavoro dell'osservatore e che dà al disegno una precisione che altrimenti non avrebbe. Rimane poi da completarlo in quei punti rimasti manchevoli.

Ma non è cosa molto agevole di vedere, appena messo l'occhio sulla camera chiara, proiettata contemporaneamente la punta del lapis e l'immagine sulla carta da disegno. Anzi occorre molta pazienza per arrivarci; e bisogna via via moderare la luce, alzare od abbassare la tavoletta finchè si sia raggiunto lo scopo. Si dovrà assicurarsi che quella che si scorge sia la punta estrema del lapis, e questo dovrà essere piuttosto duro (n. 3) e bene appuntito, per fare un segno netto e sottile.

Perchè la camera sia bene aggiustata il campo visivo deve essere

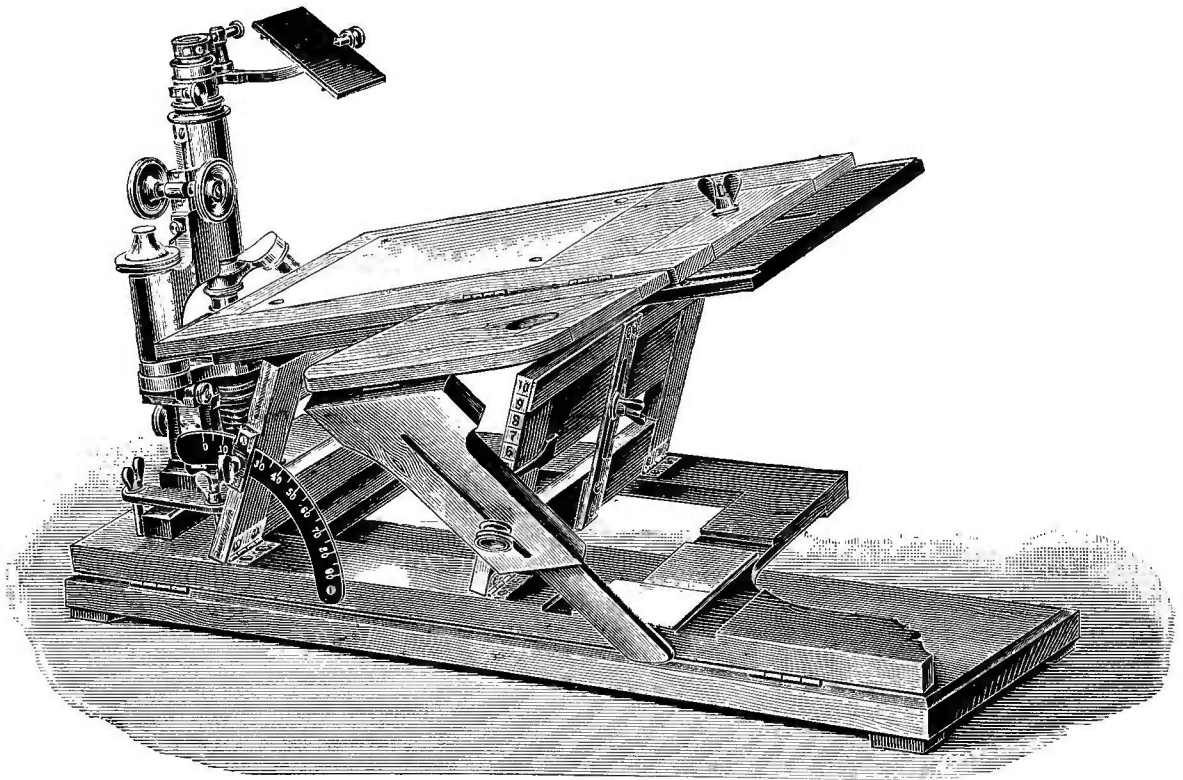


Fig. 5. — Tavoletta BERNHARD (modello ZEISS) per disegnare. A sinistra si scorge il microscopio che porta la camera chiara ABBE.

uniformemente illuminato, e la punta del lapis rimanere immobile, anche quando si fanno dei movimenti colla vite micrometrica del microscopio, e così pure quando si sposta la posizione dell'occhio. Se il campo visivo non è egualmente illuminato, vuol dire che la camera chiara è un poco inclinata o non perfettamente centrata; come non lo è se la punta del lapis si muove.

Succederà talvolta che le linee che si tracciano siano tremule od anche interrotte, ma a questo si rimedierà facilmente, rifacendole, dopo finita l'osservazione colla camera chiara, e cancellando il tratto mal fatto.

Per cancellare è molto meglio adoperare della mollica di pane, invece della solita gomma da disegnatori.

**11. Ingrandimenti dati dai disegni fatti colla camera chiara.** — Accade che il disegno colla camera chiara sia più grande dell'immagine del microscopio quando la carta da disegno non è tenuta all'altezza giusta, ma più bassa di quel che dovrebbe essere. Il disegno sarà invece più piccolo se il foglio è troppo alto. Di questo fatto in generale gli osservatori non tengono conto, dando le indicazioni dell'ingrandimento del sistema ottico come corrispondenti all'ingrandimento dato dal disegno.

Perciò è molto più conveniente di determinare preventivamente l'ingrandimento che il *nostro* occhio e la *nostra* camera chiara danno sulla *nostra* tavoletta da disegno, tenuta a quella data altezza che l'esperienza ci mostra preferibile. Per far questo si mette una scala divisa, per esempio il micrometro oculare (se non si ha quello obiettivo), al posto del preparato e si disegnano le rette che si vedono ingrandite con un dato sistema ottico, cioè con un dato oculare ed un dato obiettivo. Allora il rapporto fra la distanza delle rette parallele disegnate e la distanza reale delle divisioni del micrometro darà l'ingrandimento del disegno.

Questa operazione si ripete con tutti i sistemi ottici che si possiedono e dopo si potrà preparare una tabella nella quale, per ogni dato oculare ed obiettivo, sarà segnata la cifra corrispondente all'ingrandimento del disegno. Questo metodo non è *assolutamente* preciso, ma lo è certo molto più di quello solito, che consiste nell'indicare l'ingrandimento del disegno col riportare la lunghezza del tubo del microscopio, l'obiettivo e l'oculare; così, per esempio, si legge: 2. DD. Zeiss, 160, e questa notazione vorrebbe dire che l'ingrandimento corrisponde a quello che si ha coll'oculare 2 e l'obiettivo DD di Zeiss, tenendo il tubo del microscopio lungo 160 millimetri.

Ora, a parte che sarebbe molto più semplice in questo caso notare la cifra d'ingrandimento in diametri, com'è data dal costruttore (240), quell'ingrandimento corrisponde soltanto approssimativamente a quello del disegno fatto colla camera chiara. Non si deve dimenticare poi che quella notazione (che pure è tanto in uso), tolto il caso degli obiettivi apocromatici e degli oculari compensatori, può essere un vero *rebus* per i lettori. Gli apocromatici hanno una notazione razionale, e così pure gli oculari compensatori; ma nei sistemi acromatici la notazione degli uni e degli altri è irrazionale non solo, ma varia anche secondo i diversi fabbricanti. Ora questi sono molto numerosi, e per sapere che cosa vuol dire ogni singola notazione bisognerebbe possedere il catalogo di tutti; altrimenti riescono inutili queste diciture: GUNDLACH 3, IV, 170, LEITZ 3, 7, 160. È molto meglio dunque, più comodo, più semplice, e in fondo molto più esatto, segnare accanto al disegno la cifra corrispondente all'ingrandimento approssi-

mativo, che è stato preventivamente osservato nel modo che ho qui sopra indicato <sup>1)</sup>).

**12. Materiale e metodi per prepararlo.** — Qui per dare delle indicazioni occorre precisare prima lo scopo che ci si propone. Si tratta solo d'istruirsi in un dato capitolo dell'istologia? E allora si dovrà ricorrere al materiale che è stato più specialmente adoperato da chi si è occupato di quell'argomento e che è più facile ad ottenere (non di rado queste due condizioni si contrastano); quanto al metodo, *salvo indicazione in contrario*, si adopera sempre uno di quelli più generali. Così per esempio, supponiamo di volere dei preparati dimostrativi della struttura delle ciglia vibratili, e dei rapporti ch'esse hanno colla cellula. Bisognerà prima di tutto ricorrere allo stesso materiale e agli stessi metodi che hanno servito all'ENGELMANN per le sue notissime ricerche; e dopo, quando si vorrà controllare colle sezioni i risultati ottenuti dalla dissociazione, si dovrà fare qualche tentativo, per vedere qual'è il fissativo che mantiene meglio la forma delle ciglia e qual'è il colore che meglio le mette in evidenza. Si comincerà dai fissativi d'uso generale e si troverà presto che il sublimato acetico e quello alcoolico acido si prestano benissimo allo scopo e che per la colorazione i migliori risultati saranno dati da una tinta doppia, nucleare e plasmatica, oppure dalla saffranina.

Se invece si tratta di rivedere dei risultati speciali che sono stati ottenuti con metodi speciali si dovrà seguire scrupolosamente, nella scelta del materiale e dei metodi di preparazione, tutte le indicazioni dell'autore che ha ottenuto quei risultati. Solo dopo essersi in questo modo famigliarizzati col metodo si potrà sperimentare con materiale diverso; ed allora, se il risultato non è soddisfacente, sarà il caso di tentare quelle modificazioni che ci vengono suggerite dalla nostra propria esperienza.

Si tratta invece di ricerche che si vogliono istituire su materiale determinato? E allora bisognerà cominciare a distinguere secondo che il materiale è scarso o abbondante. Se è scarso non si dovrà arrischiare di non ricavarne alcun costrutto col tentare metodi speciali di dubbio risultato, ma si ricorrerà a metodi sicuri. Nello stesso tempo, per trarne il maggior profitto, bisognerà cercare di variare le condizioni della preparazione. Supponiamo, per esempio che si ottenga un embrione raro e di uno stadio molto precoce difficile ad aversi, come sarebbe un embrione umano. In questo caso converrà servirsi di una fissazione energica e penetrante, per esempio sublimato e acido picrico o sublimato e cloruro platinico, secondo le formule del RABL od anche della mia formula di sublimato al-

---

<sup>1)</sup> CARAZZI, *Sur les indications du grossissement dans les dessins etc.*, in Zool. Anzeiger, n. 473, 1895.

coolico acido; e la fissazione sarà agevolata riscaldando un poco (30°-40° C.) il liquido. Quindi si passerà nell'alcool forte e poi nell'alcool iodato. La colorazione non sarà fatta *in toto*, ma sulle sezioni; prima però converrà disidratare e poi rischiarare. Qui si disegnerà *in toto* colla camera chiara od al microscopio semplice, od anche a quello composto. E si controlleranno le dimensioni dell'ingrandimento del disegno con delle misure dirette e con delle misure col micrometro oculare. Dopo ciò si procederà all'imparaffinamento e all'orientazione dell'embrione. Se questa è fatta bene, si potranno avere le sezioni trasversali, che in generale sono le più facili. Se invece interessassero specialmente, perchè più dimostrative, quelle sagittali, bisognerà aver cura che nella fissazione l'embrione non si ripieghi lateralmente e bisognerà determinare con esattezza il piano di sezione ben parallelo a quello di simmetria del corpo, ciò che può essere ottenuto, per esempio, adagiando l'embrione su di una fettina rettangolare di fegato amiloide (vedi: capitolo XV).

Di quale spessore dovranno essere le sezioni? Anche qui, come nel maggior numero dei casi, converrà farne di spessori diversi, in modo da ottenere su un vetrino sezioni di 10  $\mu$ , su di un altro di 7  $\frac{1}{2}$ , su di un terzo di 5, e (se il materiale non è difficile a tagliare, se ci si può fidare del coltello, ed aiutandosi al caso coll'incelloidinamento o imparaffinamento della superficie di sezione) anche di 2  $\frac{1}{2}$ -3. E così successivamente si rifaranno sezioni di 10, di 7, ecc. Sui vetrini si metteranno dei numeri d'ordine, e se ciò non è possibile (come quando si adopera il coprioggetto) si metteranno i vetrini in ordine negli scompartimenti di una tavoletta da preparati. La colorazione si farà su di un vetrino coll'emallume o coll'emateina I A, su di un altro col liquido del Biondi, su di un terzo coll'ematosilina ferrica di HEIDENHAIN. Qualche vetrino colorato coll'emallume e poi lavato coll'acqua alluminata e con quella distillata sarà poi messo per pochi minuti nella fucsina acida, si avrà così una colorazione plasmatica e nucleare.

Se l'embrione è di piccole dimensioni la fissazione potrà essere fatta colla miscela dell'HERMANN per 24-48 ore e allora la colorazione delle sezioni sui vetrini sarà fatta con la saffranina o col metodo di GALEOTTI (capitolo VI).

Se si tratta di materiale abbondante e nello stesso tempo importante, la fissazione sarà fatta con metodi diversi, e subito dopo la fissazione e il passaggio negli alcoli si farà anche il rivestimento in celloidina, in parte, e in paraffina; riservando a tempo opportuno di fare le sezioni. Con materiale abbondante si potranno anche usare metodi speciali, quali per es. (se ne è il caso) il cloruro d'oro, secondo l'APATHY, la impregnazione nera, e l'iniezione così detta vitale, di blu di metilene, per lo studio del sistema nervoso.

Una certa quantità di materiale potrà anche, dopo fissata e disidratata, essere conservata nell'olio di legno di cedro, per il caso che si volessero fare dei disegni *in toto* e delle dissezioni o dissociazioni.

**13. Provvista del materiale.** — Questa può costituire talvolta una difficoltà; ma nel maggior numero dei casi, quando la provvista non può essere fatta da sè, si potrà rivolgersi per animali marini alla *Stazione Zoologica di Napoli*, e per animali terrestri vivi, specialmente Anfibi, ma anche Gasteropodi Polmonati, Artropodi, Rettili, piccoli Mammiferi, a FRANCESCO GORI (presso il Museo di via Romana, FIRENZE). Questi, molto noto anche in Germania dove fa continui invii, non è un naturalista e neanche un preparatore, ma un semplice raccoglitore pratico, utilissimo specialmente per avere Anfibi anuri e urodéli, così importanti per lo studio della spermatogenesi, dell'embriologia e della citologia in genere, e che sono scarsi o mancanti in parecchie località dell'Italia meridionale, in particolare.

Dalla Stazione Zoologica di Napoli non solo si potrà avere facilmente nelle stagioni opportune il più ricco e svariato materiale vivente della ricchissima fauna del Golfo di Napoli e golfi adiacenti, ma si potrà avere, in qualunque epoca dell'anno, fissato e preparato come si desidera, il materiale embriologico. Anche il materiale embriologico per lo studio del *Petromyzon Planeri* si potrà avere in abbondanza da Napoli, perchè ogni anno si raccolgono numerosi esemplari nel fiume Sarno e si fa la fecondazione artificiale <sup>1)</sup>.

Chi vive sulle spiagge del mare potrà provvedere e preparare da sè molto materiale. Per la conservazione degli animali, come pure per la conoscenza delle epoche della maturità sessuale e dell'emissione delle larve, rimando ai due lavori del LO BIANCO che ho già citati. Chi vive dentro terra potrà provvedersi facilmente di animali terrestri e d'acqua dolce, e questi ultimi avrà modo di conservare facilmente vivi in un piccolo acquario. Per lo sviluppo degli embrioni e delle larve di anfibi bisogna essere molto attenti ed impedire che alla superficie del corpo delle larve si formino delle muffe, perchè queste finiscono coll'ucciderle. Perciò è necessario che l'acqua sia continuamente mossa e ossigenata.

Per l'embriologia dei mammiferi si può avere materiale interessante dai pubblici macelli (pecora, majale). Un materiale del quale si può sempre disporre l'abbiamo nelle uova di pollo. Queste, messe in una incubatrice (e in mancanza di una vera e propria incubatrice ci si può servire benissimo di un termostato o di una stufa), mante-

---

<sup>1)</sup> La Stazione Zoologica di Napoli spedisce anche materiale preparato e conservato splendidamente per i Musei. Le forme più difficili a prepararsi e più rare di celenterati, di tunicati, ecc. si possono avere colla loro forma e aspetto naturale. Si può avere *gratis* il catalogo con i prezzi.



nuta ad una temperatura di 38-40° C., possono darci tutte le fasi dello sviluppo.

**14. Scelta del materiale.** — Per lo studio d'insieme di un organo o di un animale bisognerà, nel maggior numero dei casi, dare la preferenza agli esemplari più piccoli. La ragione ne è semplicissima, perchè se io per esempio voglio studiare bene la struttura di uno stomaco di mammifero e ne prendo uno grande, dovrò contentarmi di fare sezioni di alcuni pezzi di esso, mentre prendendo un piccolo insettivoro, o un piccolo roditore potrò senza molta fatica fare sezioni continue di tutto intero l'organo, e quindi avere un'idea precisa del rapporto e dello sviluppo delle diverse parti. Così, più particolarmente, è interessante fare per lo studio degli organi dei sensi e dell'encefalo; infatti queste parti delicate esigono una fissazione molto accurata, e non potendo senza danno essere tagliate in diversi pezzi subito a fresco, riesce opportuno l'uso di piccolissimi animali adulti, o di neonati di quelli più grandi, per poter preparare *in toto* l'organo intero.

E si tenga come regola generale, che è più vantaggioso studiare l'istologia negli organi degli animali giovani in confronto degli adulti, perchè di solito gli elementi saranno più facilmente distinguibili, le mitosi non saranno rare e quindi ci serviranno di guida per farci un'idea del modo di formarsi dei tessuti. Beninteso che non si andranno a cercare, servendosi del metodo del WEIGERT, le vie di proiezione o di associazione nei cervelli che non hanno ancora le fibre mielinizzate, e che non si pretenderà di esaminare gli organi ed i prodotti sessuali in animali che ancora non siano giunti a completo sviluppo, nè si vorrà studiare la struttura di un organo qualunque nell'embrione, i cui tessuti constano ancora di elementi non differenziati.

Per più facilmente raccapazzarsi e farsi un'idea precisa di una data specie di elemento o di tessuto, bisognerà saper scegliere il materiale e gli animali che più si prestano all'uopo, e quindi si darà la preferenza a quelli che hanno elementi più grandi. Nei diversi paragrafi, dove sono indicate le preparazioni speciali degli organi e dei tessuti, ho anche detto caso per caso quali sono le forme più adatte. Qui, in generale, ricordo soltanto questo: tra i vertebrati quelli che hanno le cellule più grandi (fanno eccezione sempre le cellule nervose) sono gli anfibi, e gli urodela più degli anuri. Nei molluschi le najadi (*Anodonta*, *Unio*, ecc.) hanno elementi molto più grandi dei lamellibranchi marini.

**15. Metodo per studiare il materiale.** — Noi possiamo studiare un dato oggetto microscopico a fresco, col mezzo delle dissociazioni, della macerazione, ecc., oppure facendone delle sezioni dopo averlo fissato, colorato, ecc. A quale dei due metodi si deve dare la prefe-

renza, quale deve precedere l'altro? Non occorre dire che vi sono tanti casi nei quali la scelta non è possibile; ma, a parte questi, credo che in generale si debbano usare tutti e due, e (contrariamente a quello che si dice di solito e che io stesso ho sostenuto altra volta) il secondo, quello delle sezioni e dei preparati permanenti, debba precedere il metodo dell'osservazione a fresco, per dissociazione, macerazione, ecc. E la ragione è questa: che, finchè non si conoscono bene i rapporti reciproci dei diversi organi e delle parti che li compongono, è facile ingannarsi volendo formarsi un giudizio con lo studio degli elementi isolati ed osservati a fresco, tolti dalla posizione che occupano nell'organismo vivente.

**16. Uso del microscopio semplice e di quello composto; ingrandimenti.** — Quando non si tratta di pura citologia o di pura istologia, ma si vuole procedere nello studio o di tutto un organismo o di un dato organo, sarà sempre bene di cominciare con l'adopere una lente BRÜCKE, o il microscopio semplice da dissezione, oppure anche (quando l'oggetto sia di piccolissime dimensioni) un debole ingrandimento del microscopio composto. Ci si farà così un'idea generale dell'oggetto stesso, e se questo non è ancora stato trattato con alcun reagente, si avranno dei dati precisi sulle sue dimensioni e sul colore. Anche quando si debba poi imparaffinare e sezionare, sarà opportuno, dopo la fissazione, l'indurimento e la disidratazione, osservare l'oggetto nell'olio rischiarante (olio di legno di cedro, ecc.), sia per farne un disegno d'insieme, sia per poter vedere molti particolari di struttura, sia per prendere delle misure, nel caso che non si fosse a fresco.

Il microscopio semplice è poi un aiuto prezioso nelle dissezioni e dissociazioni, nell'orientamento di embrioni o di piccoli organismi, e per disporre in un modo determinato sul vetrino dei preparati delicati. Se si tratta di dissezioni di organi di mole rilevante e che vanno tenuti sott'acqua, sostituirà bene il microscopio semplice la lente Brücke, che ha il vantaggio di un fuoco lungo e di un campo abbastanza grande.

Nell'uso del microscopio composto si dovrà aver presente di *mai* cominciare l'osservazione con un ingrandimento forte, ma *sempre con uno debole*; e preferendo un oculare debole e l'obiettivo più forte, anzichè viceversa. Con un debole ingrandimento si potrà farsi un'idea complessiva del preparato e riconoscere subito quel tratto sul quale si vuol specialmente richiamare la nostra attenzione. L'ingrandimento ottenuto con un oculare debole (1-3) e con un obiettivo più forte ha il vantaggio di dare una luce maggiore ed un campo più grande di quel che si ha con un forte oculare ed un obiettivo più debole. Quindi l'aumento dell'ingrandimento sarà ottenuto comunemente col sostituire un obiettivo più

forte ad uno più debole e mantenendo in posto lo stesso oculare. Tuttavia si tenga conto che questa regola soffre delle eccezioni, e che vi sono dei casi nei quali giova dare la preferenza ad un obiettivo debole e ad un oculare forte.

Nei sistemi di obiettivi acromatici a secco più forti (7, 8 e 9 di KORISTKA), come pure in quelli apocromatici ad immersione, per uno stesso obiettivo vi sono due forme di apertura numerica diversa. Le differenze per l'osservazione che si hanno dalle due aperture numeriche saranno spiegate altrove (cap. XVIII): basti ricordare che per le esigenze del lavoro ordinario nel sistema di obiettivi a secco si dà la preferenza a quello con apertura numerica maggiore, ma che, potendo spendere, è meglio possedere sempre la coppia, cioè anche l'altro con minore apertura, perchè assai più penetrante. Mentre per gli apocromatici ad immersione più forti (2 mm.-1,5 mm.) si preferisce quello ad apertura numerica minore solamente perchè è meno delicato.

Quando si oltrepassa l'ingrandimento di 500 diametri, bisogna ricorrere all'obiettivo ad immersione omogenea, del quale l'istologo non può assolutamente fare a meno, e che per fortuna oggidì si vende dai costruttori ad un prezzo abbastanza mite <sup>1)</sup>.

È un errore, pur troppo ancora molto diffuso fra gli istologi, credere che dell'obiettivo ad immersione ci si debba servire soltanto quando l'ingrandimento coll'obiettivo a secco è insufficiente. Insisto su questo punto: *quando si oltrepassano i 500 diametri bisogna adoperare l'obiettivo ad immersione*, perchè quelli forti a secco (quali sarebbero i tre ultimi del KORISTKA) danno sempre una immagine oscura e poco definita (o risolta, che è lo stesso), e tanto più oscura quando si ricorre agli oculari forti (3, 4, 5). L'obiettivo ad immersione col suo grande angolo d'apertura, mai inferiore ad 1.30, dà delle immagini chiare e ben risolte, di molto superiori per chiarezza a quelle che si ottengono con obiettivi a secco.

Ed è proprio inconcepibile come istologi provetti non siano convinti di questa così ovvia ed elementare verità, e tengano l'obiettivo ad immersione nascosto in una *sancta sanctorum*, dalla quale si toglie soltanto nelle grandi occasioni.

L'obiettivo ad immersione deve stare sul tavolo dell'istologo, anzi sul revolver del microscopio, come un qualunque altro obiettivo, e dev'essere adoperato di frequente, direi di continuo, per controllare quello che non si può mai veder bene coll'obiettivo a secco. Chissà quante erronee scoperte, con le quali ci hanno rintonato le

---

<sup>1)</sup> Come si vedrà più avanti, il KORISTKA di Milano dà per 200 lire un buonissimo obiettivo semiapocromatico ad immersione omogenea e due oculari compensatori.

orecchie anche di recente, sarebbero per fortuna non nate se chi le ha proclamate avesse saputo servirsi di un buon obiettivo ad immersione! Eppure a me è capitato di sentirmi dire da uno, che avrebbe appunto la pretesa d'aver fatto una grande scoperta citologica, ch'io non mi persuadevo della cosa dall'esame dei suoi preparati perchè mi servivo di un buon obiettivo apocromatico ad immersione. « Se vedesse (aggiungeva candidamente) come è evidente la cosa con un comune obiettivo a secco!

Sta in fatto, ed è ovvio ed elementare il comprenderlo, che il controllo con l'obiettivo ad immersione è necessario quando si crede di aver scoperto qualche cosa di nuovo; come è ovvio ed elementare comprendere che sarà sempre meglio lavorare con uno strumento più preciso e più perfetto, che non con uno imperfetto; e come sarebbe strano che un chimico preferisse di fare una pesata di precisione con una bilancia comune, od un fisico, volendo avere una misura esatissima, rinunziasse all'uso di un buon catetometro, così è da considerare come uno strano misoneismo quello di non pochi istologi, che non si sono ancora persuasi dell'utilità, anzi della necessità di un obiettivo ad immersione; senza essersi accorti che così facendo si rassomigliano molto a quel nostro professore di botanica, che fino alla morte sostenne di non aver mai avuto bisogno, nei suoi studi, del microscopio, perchè la vista gli serviva ancor bene.

Adoperare l'obiettivo ad immersione non vuol dire niente affatto servirsi di forti ingrandimenti; anzi sconsiglio senz'altro gli oculari forti; e così col semiapocromatico del KORISTKA, si darà la preferenza all'oculare compensatore 4, il più comodo ed il più adatto per il lavoro ordinario, ricorrendo solo eccezionalmente al 6 o all'8, e soltanto per qualche particolare. Con l'oculare 4 si ha un ingrandimento di circa 600 diametri, ma con una nettezza e chiarezza d'immagine ben superiori a quelle che si hanno con l'obiettivo a secco 9\* e con l'oculare 3, sistema che dà lo stesso ingrandimento.

Del resto si veda anche il capitolo XVIII.

**17. Osservazioni al microscopio: note e disegni.** — Per ben vedere al microscopio bisogna osservare a lungo, con insistenza lo stesso preparato, anzi lo stesso punto del preparato, che si ha nel campo del microscopio. Non dico già che si debba arrivare alle esagerazioni di M. HEIDENHAIN, il quale ha sostenuto che fino a quando l'osservazione non è continuata nello stesso punto per due ore almeno, non si può sapere con certezza quello che c'è in esso da vedere. Anzi credo che il voler così esageratamente forzare la nostra attenzione darebbe per risultato di farci distinguere più niente. Ma certo è che quando l'occhio si è assuefatto ad osservare intensamente vede molto più di quel che si scorge ad un esame superficiale. Nessun dubbio che chi pone l'occhio per la prima volta su di un pre-

parato vede molto meno di chi l'ha studiato con diligenza e per lungo tempo.

Al principiante si deve dunque raccomandare di non essere impaziente (e come si potrebbe diventare micrografi senza possedere una discreta quantità di pazienza?), e non contentarsi di un'occhiata affrettata e neanche di un esame superficiale; ma di guardare a lungo e con diligenza. Molte volte un preparato, che a prima vista ci è parso mal riuscito ed inconcludente, ci rivelerà, dopo un esame approfondito, dei particolari interessanti. Ed è qui che soccorre specialmente l'obiettivo ad immersione, perchè esso ci può far scorgere quel che l'obiettivo a secco non lasciava neanche intravedere e che può essere di grande importanza per lo studio che si sta facendo. Se non fosse un'esagerazione, direi quasi che con un esame attento fatto con l'obiettivo ad immersione non vi sono preparati del tutto brutti.

Quanto più l'occhio si esercita nell'esame e tanto più diventa capace di scorgere quel che ad un inesperto sfugge completamente. Succede, infatti, per l'osservazione microscopica, quel che per qualunque altro esercizio degli organi visivi; e come il montanaro fra i monti nativi e il marinaio sull'oceano possiedono un'acutezza di vista che permette loro di scorgere con facilità quel che rimane del tutto invisibile all'inesperto abitante del piano, così l'occhio esercitato del micrografo scorge nel preparato una quantità di particolari che al profano rimangono nascosti.

Lavorare assiduamente, esercitarsi ogni giorno per qualche ora: ecco il segreto per riuscire. Che l'osservazione microscopica sia dannosa alla vista è un errore che non vale la pena di confutare; quanto più ci si esercita e tanto meno ci si stanca. La sola precauzione da prendere è quella di non rimettersi allo studio microscopico subito dopo mangiato, e di riparare l'occhio dai raggi tangenziali che arrivano fra l'orlo dell'orbita e la sommità dell'oculare.

Nell'osservazione prolungata con forti ingrandimenti di oggetti trasparenti incolori o uniformemente colorati, succede non di rado che è difficile accertarsi di quel che si vede. Prima di tutto è necessario che l'occhio s'abituï, come ha notato M. HEIDENHAIN, per percepire certe finezze; ma anche quando l'occhio è pervenuto a ben discernerele, talune strutture delicate ora si mostrano nettamente allo sguardo, ora svaniscono: ciò forse perchè la stanchezza dell'occhio che intensamente cerca di vedere le immagini poco visibili su di un fondo unicolore ed uniformemente illuminato, produce dei disturbi momentanei dell'accomodazione, che non sempre riesce di compensare mediante la vite micrometrica. Ora, se in tali condizioni, l'occhio è colpito da un'immagine più fortemente accentuata che emerge tra le altre circostanti (ad esempio per una diversa rifrangibilità), e

se quella poi subitamente scompare, esso, nel momento immediatamente successivo, distinguerà meno bene o non vedrà più affatto le immagini meno appariscenti che prima riusciva a vedere distintamente, e che poi a poco a poco si renderanno nuovamente visibili. Il fenomeno non è sostanzialmente diverso da quello che ci accade quando, essendoci abituati a discernere gli oggetti che ci circondano con una luce debole, guardiamo d'un tratto un corpo molto luminoso; dopo, per un certo tempo, non saremo più capaci di vedere quello che pur chiaramente vedevamo prima che l'occhio fosse colpito dalla forte luce <sup>1)</sup>).

Infine si deve tener conto che, anche per l'osservazione microscopica, come per tutti gli altri esercizi dei nostri organi dei sensi, non si ha sempre la stessa attitudine e che, mentre in certi giorni si vede molto bene e senza stancarsi, in certi altri siamo in condizioni così disadatte che è più conveniente smettere. Chi poi è disturbato dalle così dette mosche volanti deve sospendere senz'altro l'osservazione e non riprenderla finchè non siano del tutto cessate.

Quando si esamina un preparato e vi si trova un particolare interessante, bisogna prendere subito nota con precisione di tutte le indicazioni necessarie per poterlo ritrovare. Si dovrà quindi o su di un registro o su di una scheda, segnare il numero del preparato e, se questo non ha il cartellino con su scritte brevemente le operazioni più importanti che si sono fatte, si dovrà prenderne nota nel registro o sulla scheda stessa, aggiungendo poi, se è il caso, il numero d'ordine che spetta alla sezione presa in esame, e quindi descrivendo brevemente quel che vi è d'interessante, aggiungendo anche uno schizzo, o meglio ancora un disegno, del particolare osservato.

Bisogna non fidarsi mai della memoria, e prendere l'abitudine di tener nota di tutto. Succede che anche le cose più importanti e che si credono indimenticabili sfuggono col tempo e si dimenticano completamente, nè sarà possibile trovarne più traccia se non si è preso a tempo opportuno il relativo appunto scritto. L'utilità del disegno (sia pure di un semplice schizzo) è poi grandissima, non solo perchè così si ha sott'occhio a prima vista quel che ci interessa e che solo una lunga descrizione ci spiegherebbe, ma più di tutto perchè, quando si disegna, si è obbligati ad osservare con molta attenzione, e così si finisce con lo scorgere e col trovare nel preparato quel che ad una semplice osservazione ci sarebbe senza dubbio sfuggito.

Per ritrovare un dato punto di un preparato sono stati suggeriti molti espedienti. Uno semplicissimo, ma anche poco preciso, consiste

---

<sup>1)</sup> RAFFAELE, in *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1896, pag. 204.

nel segnare con l'inchiostro dello SCHÖBEL un piccolo cerchio sul vetrino coprioggetti, che comprenda nel suo interno il tratto che interessa specialmente. Riesce così abbastanza facile ritrovarlo, col limitare l'esame della sezione alla superficie contenuta dentro della circonferenza. Una maggiore precisione si ha quando si dispone del tavolino traslatore, perchè allora basterà prender nota delle due misure ortogonali, che corrispondono alla centratura del punto in esame, e con quelle due cifre si potrà quando si voglia rimettere il preparato nell'identica posizione.

## CAPITOLO II.

### Fissazione dei tessuti.

**18. Generalità.** — L'esame a fresco dei tessuti si fa per dissociazione e per lacerazione; difficilmente il tessuto può osservarsi intero, a meno che non si tratti di una membrana sottile. Per molti anni lo studio istologico si limitò a questi metodi; ma era naturale che se ne risentissero subito i grandi inconvenienti. Colla dissociazione non si possono mantenere i rapporti fra le diverse parti che si osservano, e d'altronde, occorrendo tenere i preparati in un liquido, questo finisce sempre col guastare le cellule producendo delle alterazioni nel protoplasma.

La prima idea che si presentò agli istologi fu quella di avere delle sostanze che indurissero il tessuto in modo da poterne fare col rasoio delle fette sottili. In seguito si trovarono anche i primi fissativi, delle soluzioni cioè che mentre indurivano avevano anche la proprietà di combinarsi colle sostanze albuminoidi degli elementi, conservandone inalterata la struttura. Un mezzo d'indurimento molto semplice, che qualche volta conviene ancora di adoperare, è il freddo.

Un pezzo di tessuto viene congelato esponendolo ai vapori d'etere e così s'indurisce tanto da poter essere tagliato in fette sottili. Ma queste alla loro volta devono poi essere fissate, se si vogliono conservare a lungo.

Un induritore, che è anche un fissatore, è l'*alcool* forte (90-95 per cento ed anche assoluto); esso, penetrando rapidamente e sottraendo l'acqua al tessuto, non solo indurisce, ma anche mantiene abbastanza bene la forma, ma non la struttura degli elementi, quando venga cambiato due o tre volte in modo da possedere sempre la sua forza disidratante. Anche l'*alcool* debole (33 %) s'è mostrato in qualche caso un discreto fissatore.

Ma esso non è mai il migliore dei fissativi; alle volte raggrinza gli elementi disidratandoli troppo rapidamente, e molto spesso al-

tera la struttura, la forma e la posizione del nucleo; non è così velenoso da uccidere istantaneamente il protoplasma prima di indurvi cambiamenti. Si cercarono allora dei corpi che agissero come sostanze velenose e che dessero combinazioni insolubili cogli albuminoidi degli elementi. Il primo vero fissativo di questo genere fu l'*acido cromico* e poi i suoi sali. Questi e quello ebbero una notevolissima importanza ed ancora oggi sono usati, ma molto meno, perchè rendono fragili e non molto bene colorabili i tessuti; oltre a ciò alterano la struttura nucleare.

Entrato da molto tempo nella tecnica istologica, l'*acido osmico* (più esattamente tetrossido d'osmio) vi occupa sempre un posto importante, come dirò più avanti. Ma quello che supera tutti è senza dubbio il *sublimato corrosivo*, ossia bicloruro mercurico, che, usato largamente e già da molti anni alla Stazione Zoologica di Napoli, a poco a poco si diffuse in tutti i laboratori d'istologia ed oggi è universalmente riconosciuto come uno dei più importanti fissativi. In parecchi casi è utile anche l'*acido picrico*, e molte altre sostanze, delle quali sarà detto più avanti.

Il numero dei fissativi introdotti nella tecnica istologica è straordinariamente grande, perchè oltre ad una quantità di sostanze semplici (cioè soluzioni di un sale o di un acido) si pensarono e si attuarono le più complicate, e qualche volta le più spropositate mescolanze. Vi furono di quelli, per esempio, che misero insieme un acido con un sale, senza occuparsi di vedere se questo si riduceva a semplice e inutile ossido e quello restava di molto diminuito nella quantità, mentre veniva aumentata l'acqua, e quindi indebolita la forza della soluzione. Ma anche trascurando questi ed altri, sebbene men grossi pur tuttavia imperdonabili spropositi chimici, sta il fatto che la tecnica istologica, è in gran parte basata su di un cieco empirismo. Ed ancora oggidì dei migliori e più usati fissativi ci manca una precisa propedeutica, e per lo stesso tessuto uno vi dice che la fissazione col sublimato deve durare da 12 a 24 ore, mentre un altro vi assicura che voi sciuperete tutto se lo farete agire per più di qualche minuto. Così per le notissime miscele del FLEMMING o dell'HERMANN e per lo stesso materiale si va da *pochi minuti a qualche mese!*

Il lettore capisce dunque come non sia possibile dare delle indicazioni precise ed assolute. Eppoi giova avvertire un'altra cosa: la fissazione si propone due scopi ben distinti, a seconda che si tratta di avere una buona conservazione dei rapporti d'insieme dei varii tessuti di un organo, e dei varii organi fra di loro, oppure che si richiede specialmente di studiare soltanto una data categoria di elementi, oppure la struttura intima delle cellule. Si potrebbe dunque distinguere nei fissativi quelli che servono a scopi *generali* da quelli



*speciali*; pur tenendo presente che un vero fissativo generale non esiste, perchè, anche volendo raggiungere il primo obiettivo, cioè una buona conservazione morfologica, dobbiamo modificare la fissazione secondo i differenti organi ed i diversi animali.

**19. Norme più importanti per avere una buona fissazione.** — Prima di tutte questa: il tessuto, o pezzo d'organo, o d'animale da fissare dev'essere quanto più si può *fresco*, se possibile ancora *vivente*. Seconda: più il pezzo da fissare è piccolo e meglio agirà il liquido fissatore. Terza: questo in generale deve essere fatto da poco tempo e preso in quantità rilevante rispetto al pezzo da fissarsi; cioè di un volume di 20-30 ed anche 50 volte maggiore; non sarà male se il liquido verrà cambiato una volta.

Queste tre norme sono così semplici e di una utilità tanto evidente, che non hanno bisogno di glosse. Alla prima non c'è da obiettare che una cosa; quando si tratta d'istologia umana è quasi impossibile avere del materiale molto fresco; l'autopsia non essendo permessa che 24 ore dopo constatata la morte. Quindi i tessuti umani non ci danno il migliore materiale per lo studio più delicato delle strutture cellulari. La seconda norma viene molto spesso trascurata dai principianti, i quali dimenticano che un grosso pezzo immerso nel fissativo resterà ben conservato soltanto alla periferia, perchè il liquido non potrà penetrare nell'interno. Talvolta può darsi che non basti aver fissato una piccola porzione di un organo e che sia necessario conservarne un gran tratto, e così pure ad uno zoologo occorre sovente di fissare tutto intero un animale anche voluminoso. Nel primo caso si farà l'organo a piccoli pezzi, in modo che nello spessore essi non superino possibilmente mezzo centimetro. Qui va ricordata ancora una cosa: quando si parla di pezzi piccoli ci si riferisce soltanto alla loro grossezza, perchè un organo, od un animale, che sia lunghissimo e largo, ma di poco spessore, può essere penetrato facilmente. Così, per esempio, un verme, un lungo pezzo d'intestino di piccolo mammifero, o di altro animale, una porzione di un nervo o di un vaso, una membrana, ecc. Tuttavia, anche in questi casi, sarà sempre prudente fare qualche taglio trasverso per facilitare la penetrazione del fissativo, tagli che possono essere fatti in modo da non separare completamente l'organo in più pezzi, quando interessa conoscere la posizione di questi. Restando negli esempi sopra ricordati, bisogna aver presente che il verme ha lo strato esterno poco permeabile, mentre nell'interno vi sono tessuti delicati che hanno bisogno di una rapida ed energica fissazione; ciò è vero anche per l'intestino, per il pezzo di nervo e di vaso, che hanno uno strato esterno costituito da una robusta e poco permeabile guaina connettivale.

Ma molte volte occorre fissare un organo tutto intero e che, pure inciso in diversi punti, rimane sempre formato da pezzi troppo voluminosi. In questo caso si inietterà per le vie arteriose (prima di fare le incisioni) del liquido fissativo, fino a che lo si veda sgorgare dalle vie venose ben limpido. Allora si metterà l'organo nel liquido fissativo, facendovi quel maggior numero di tagli che sarà consentito dallo studio da intraprendere: questo caso del resto si presenterà ben di raro.

Può darsi che il pezzo d'organo o d'animale da fissare sia così poco consistente da non poter essere tagliato netto col coltello; in questo caso lo s'immerge nel liquido fissativo per qualche tempo, una mezz'ora circa, e quando ha già acquistato una certa consistenza, si toglie dalla soluzione, si taglia e si rimette nel fissativo.

Quanto alla terza norma, possiamo ricordare che le soluzioni più costose (acido osmico, cloruro di platino, miscele del FLEMMING e dell'HERMANN) agiscono bene in piccola quantità e senza bisogno di essere cambiate. Sono anche quelle che non danno una buona fissazione altro che di pezzi molto piccoli, cioè di uno spessore inferiore ai 5 mm. Le altre soluzioni (a base di sublimato, di acido picrico, coi sali dell'acido cromatico, ecc.) devono essere adoperate in quantità rilevante, cioè, come ho già detto, 50 volte il volume del pezzo: ed è sempre opportuno cambiarle una volta.

È molto difficile dare delle norme sulla durata della fissazione, perchè questa parte della tecnica esigerebbe molte e noiose esperienze di controllo. Ho già detto quanto sia grande il disaccordo fra gli istologi su questo importante argomento; tuttavia credo di potere affermare che, in generale (ed a suo tempo ricorderò le più importanti eccezioni), sia da preferire una fissazione di lunga durata a quelle brevi. E per lunga durata intendo da qualche ora fino a 24 o 48 ore. Sembra che la prolungata immersione nel liquido, mentre assicura la completa penetrazione del fissativo, non induca alcun cambiamento dannoso nella struttura dei tessuti; e quanto all'eccesso di fissativo, che si sarà depositato negli interstizi, esso può essere tolto sempre con lavaggi accurati e molto prolungati, o col cambiare diverse volte e per qualche giorno di seguito il liquido (alcool) nel quale il pezzo è posto ad indurire, dopo la fissazione.

Altro elemento che ha molta importanza, e sul quale pure non è possibile dare indicazioni precise, è la concentrazione della soluzione del fissativo da usare. Qui molte volte ci urtiamo in due condizioni contrarie: da una parte dobbiamo cercare che il fissativo agisca con rapidità e con energia, dall'altra dobbiamo impedire che i tessuti si raggrinzino o diventino friabili. Su questo punto così delicato ed importante della tecnica istologica bisogna che ognuno,

per le proprie ricerche, faccia parecchie prove, perchè le indicazioni generali valgono poco e non di rado quelle date dagli istologi, anche i più reputati, sono infondate.

La forza della soluzione varierà a seconda delle ricerche che si vogliono fare e della penetrabilità del materiale da fissare. Quando, più che una rapidissima fissazione, si desidera conservare i rapporti morfologici dell'organo, e questo non ha alcun rivestimento compatto ed è di piccole dimensioni, si potranno usare soluzioni diluite; mentre che, se dobbiamo fissare con rapidità le cellule ed il loro contenuto, oppure quando si abbia a che fare con organi rivestiti di tessuto poco permeabile, si ricorrerà a soluzioni più concentrate, od anche a soluzioni alcoliche, invece che acquose (per il sublimato); oppure ci si aiuterà impiegando il fissativo a caldo, anche bollente, ma solo per breve tempo (da 5 a 10 minuti). Non si dimentichino poi i tagli, o le iniezioni del fissativo, fatte al disotto dello strato poco permeabile, che si perfora colla punta di una cannula.

Per gli animali marini viene consigliato di servirsi di soluzioni più forti di quelle usate per gli animali d'acqua dolce o terrestri. Non credo giusta questa indicazione. Piuttosto sarà da vedere se il fissativo si combina con i sali marini; e quindi, in questo caso, il liquido verrà cambiato due ed anche tre volte, a pochi minuti di distanza; e con tagli ci si assicurerà della rapida penetrazione del fissativo. Quando lo si possa fare senza danno del tessuto o dell'organo da studiare, sarà buona cosa lavarlo rapidamente nell'acqua distillata, prima di metterlo nel fissativo; questo è detto solo per gli animali marini.

**20. Sublimato corrosivo.** — È un sale bianco, molto pesante, *vele-nosissimo*. Le sue soluzioni intaccano tutti i metalli, l'oro compreso; si stia dunque attenti, e si eviti per quanto possibile di immergervi bisturi, forbici, ecc.; e, quando non si può farne a meno, si compia l'operazione al più presto possibile, e poi si asciughino diligentemente gli strumenti.

Il sublimato annerisce anche l'epidermide; si cerchi quindi di toccarlo il meno possibile.

Le soluzioni di solo sublimato nell'acqua sono durature, ma le miscele con acidi vanno rinnovate di sovente, ogni paio di mesi, altrimenti si alterano e il fissativo perde molto della sua forza. Devono reagire, alla carta di tornasole, leggermente acide, se sono soluzioni in acqua.

Il sublimato si scioglie nell'acqua distillata in proporzioni variabili colla temperatura, in media circa 5-6 g. per ogni 100 cc. d'acqua. Aggiungendo all'acqua distillata 0,5-0,75 od anche un grammo di sale comune (cloruro di sodio) si scioglie in essa più sublimato, fino a

13 g. per cento. Questa è la soluzione che comunemente si dice *acquosa satura*, di così largo uso nella tecnica istologica <sup>1)</sup>.

Il sublimato si scioglie nell'alcool più facilmente che nell'acqua distillata, in quello assoluto se ne disciolgono 33 g. in 100 cc.; ancora di più nell'etere solforico.

Si usa fare la soluzione alcoolica satura nell'alcool a 90 %; contiene circa 8-10 g. di sublimato per cento.

Il sublimato fa parte di un gran numero di miscele; le più in uso sono quelle che contengono dell'acido acetico o dell'acido nitrico. Vauno ricordate qui le miscele seguenti:

**21. Fissativo del Mingazzini.** — Soluzione acquosa satura di sublimato parti 2, alcool assoluto 1, acido acetico glaciale 1. Diciamo qui una volta per sempre che è un inutile sciupio di denaro adoperare dell'alcool assoluto quando poi si deve aggiungere dell'acqua. Basterà mettere dell'alcool a 90 % in quantità un poco maggiore e in corrispondente minore quantità d'acqua per avere lo stesso risultato. Eppure una così ovvia e giustificata modificazione appare come una novità! Ed una volta per sempre va pure avvertito che non è abbastanza chiaro parlare di una soluzione acquosa satura di sublimato. Molto meglio, molto più preciso indicare quanti grammi per cento centimetri cubi d'acqua; altrimenti si può anche essere in dubbio se si tratta di soluzione satura nell'acqua distillata o nell'acqua con 0.50, 0.75, 1 % di cloruro sodico; e dall'una all'altra c'è la differenza del doppio!

Tornando alla miscela del MINGAZZINI è da avvertire che, per gli usi generali, il % di acido acetico è certamente troppo elevato, e molto più utile sarà una soluzione così modificata:

**22. Sublimato alcoolico acetico.** — Sublimato g. 8, acqua distillata (con 0.5 di NaCl) 100 cc., alcool 90 % 50 cc., acido acetico glaciale 5 cc.

**23. Fissativo del Gilson.** — Nella formula originale si hanno delle quantità scomode a misurarsi, e perciò era già stata da me <sup>2)</sup> così modificata: acqua distillata un litro, alcool a 70 % 100 cc., sublimato corrosivo 20 g., acido acetico glaciale 5 cc., acido nitrico puro concentrato cc. 15; ma ho trovato più vantaggioso aumentare del doppio il sublimato e ridurre di poco l'acqua in modo da far crescere il potere fissativo e penetrante della soluzione. Ecco la formula modificata, che consiglio insieme con la precedente perchè dà un

<sup>1)</sup> Il sublimato non si scioglie presto; è preferibile riscaldare l'acqua e poi lasciarla raffreddare lentamente. Il sublimato in eccesso si deposita sul fondo del recipiente in lunghi cristalli aghiformi.

L'aggiunta di NaCl all'acqua facilita la soluzione.

<sup>2)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1896, pag. 389.

fissativo d'uso generale, molto buono anche per pezzi assai voluminosi e per animali marini. Ma in quest'ultimo caso il liquido sarà cambiato dopo pochi minuti e l'oggetto, se voluminoso, inciso profondamente, quando vi sia possibilità di farlo senza danno.

**24. Sublimato nitrico acetico.** — Acqua distillata (con 4 g. di NaCl) 800 cc., alcool a 80 % 200 cc., sublimato g. 40, acido acetico glaciale 5 cc., acido nitrico puro concentrato 15 cc.

Il sublimato è stato unito anche a tanti altri acidi: cromatico, osmico, picrico. Fra le più importanti miscele abbiamo le seguenti:

**25. Fissativo del Mann.** — Soluzione acquosa satura di sublimato parti 1, acido osmico 1 % parti 1; si uniscono i due liquidi solo al momento di servirsene, e si possono aggiungere anche piccole quantità (da 0.5 a 2 %) di acido acetico glaciale. La fissazione si fa all'oscuro per 12-24 ore. Questo fissativo è raccomandato dall'APÀTHY per lo studio delle fibrille nervose (vedi capitolo XXIV).

**26. Fissativo del Rabl** <sup>1)</sup>. — Soluzione satura di sublimato volumi 1, di acido picrico 1, acqua distillata 2. Formula che più razionalmente si potrebbe esprimere così, supposto che il tenore del sublimato sia di 8 %: Prendi volumi eguali di una soluzione acquosa 4 % di sublimato e 0.5 % di acido picrico.

**27. Fissativo del vom Rath.** — Soluzione satura nell'acqua a caldo di sublimato 1, idem a freddo di acido picrico 1, acido acetico glaciale 1 %.

**28.** Darò più avanti alcune indicazioni sull'uso di queste diverse soluzioni; ora va notato che in generale:

1.° Il *sublimato solo* è un buon fissatore, discretamente penetrante, e che permette una facile colorazione dei tessuti fissati. Si lascia agire per alcune ore (2-3 di solito, talora anche 24). La sua penetrazione si rende evidente coll'imbianchimento del pezzo; quando anche nell'interno si vede, dopo fatto un taglio, il colore bianco, vuol dire che il fissativo è penetrato completamente. Si deve passare il pezzo nell'acqua distillata alla quale si è aggiunto 1 % di *tintura di jodo-jodurata* (joduro potassico 5 g., H<sup>2</sup>O 5 cc.; jodo g. 0,5, alcool 90 % cc. 45; si uniscono le due soluzioni), ed ivi si lascia per parecchie ore; dopo si passa nell'alcool a 70 %, al quale si è aggiunto della tintura di jodo-jodurata, fino ad avere un liquido color marsala: si lascia il pezzo per non meno di 24 ore, e, se si vede il color giallo scomparire, si cambia l'alcool, al quale si aggiunge dell'altra tintura di jodo-jodurata, e si continua per due, tre o più giorni, finchè il color giallo dell'alcool non scompare. Il jodo-jodurato si adopera per togliere il sublimato in eccesso <sup>2)</sup>, che precipiterebbe nei tessuti,

<sup>1)</sup> Vedi più avanti un altro fissativo del RABL.

<sup>2)</sup> Non è vero, come credono il LEE ed il GILSON, che l'aggiunta del joduro porti via tutto il sublimato (LEE, *Vademecum*, IV ediz., 1896, pag. 39).

sotto forma di cristalli. L'eccesso di sublimato non si toglie se per 48 ore almeno non si lascia il pezzo fissato nell'alcool jodo-jodurato, cambiato per 3-4 volte. Il mercurio del sublimato si combina col jodo per formare un joduro solubile, tanto nell'acqua che nell'alcool, ed incolore. I pezzi levati dall'alcool jodurato vanno passati nell'alcool a 90 % puro, e questo cambiato un paio di volte, oppure messo in quantità rilevante (100 volte il volume dell'oggetto) e lasciato per tre o quattro giorni. In tal modo, mentre si otterrà un buon indurimento del pezzo, si sarà sicuri che tutto l'eccesso del sublimato è passato nell'alcool. Il sublimato acquoso da solo, cioè non accompagnato dall'alcool e da un acido, è fissativo poco preciso per le ricerche sulla cariocinesi.

2.° Il *sublimato alcoolico* ha un'azione più rapida e penetrante di quello acquoso; da impiegarsi con riguardo per evitare il raggrinzamento dei tessuti, quando l'alcool è in grande quantità. Si può far seguire a quello acquoso, dopo che questo ha agito per un'ora. Il sublimato alcoolico permette una buona e facile colorazione. Dopo qualche ora di fissazione il pezzo viene passato *direttamente* nell'alcool a 95 % jodo-jodurato. Per il rimanente vedi sopra al n. 1.

3.° Il *sublimato acido*, con una leggera acidulazione di acido acetico glaciale, è molto più rapido nella penetrazione. I pezzi non devono essere lasciati per molto tempo nel fissativo, e tanto meno quanto più è elevato il % dell'acido. In generale non consiglieri l'uso delle soluzioni che contengono molto acido acetico, come quelle originali del MINGAZZINI (25 %) o del CARNOY (33 %), se non in casi speciali, quando con prove numerose di controllo si è convinti che con esse si hanno delle fissazioni buone, superiori a quelle che si ottengono cogli altri mezzi. Il fissativo deve, in questi due casi, agire per pochi minuti soltanto e dopo si trasporterà direttamente il pezzo nell'alcool jodo-jodurato. Meglio quando occorre una fissazione energica servirsi della formula da me proposta (§ 24).

Ritengo in generale vantaggiosa una leggera quantità di acido acetico ( $\frac{1}{2}$ -2 %) per facilitare la penetrazione del sublimato, e per la precisione della fissazione, specialmente negli elementi nucleari.

Le miscele non molto concentrate, come quella del GILSON, che forse è anche troppo debole, ed alla quale si può sostituire con vantaggio la mia, si prestano molto bene anche per pezzi piuttosto grossi, e si possono lasciare agire a lungo. I pezzi devono passare direttamente nell'alcool jodo-jodurato.

4.° Il *sublimato*, mescolato con *acido osmico* o con *acido picrico*, avrebbe lo scopo di sommare le sue proprietà a quelle degli altri due fissatori; ma io non consiglieri in generale le miscele coll'acido picrico, quella del RABL in specie; piuttosto reputo migliore la miscela coll'acido osmico, sia da sola, che leggermente acidulata.

Più avanti darò le ragioni di queste preferenze e di queste esclusioni.

**29. Acido picrico**, in cristalli di color giallo solfo, si scioglie lentamente nell'acqua (circa 1 g. ‰), assai solubile nell'alcool. La soluzione usata ordinariamente è quella *acquosa satura*.

Molto in voga, specialmente per gli artropodi, è reputato più penetrante del sublimato, col quale pure si fa una miscela, come abbiamo già visto, e lo si mescola anche con soluzioni osmiche.

Io non posso dire quali vantaggi abbia per la fissazione degli artropodi, ma in generale per i tessuti dei vertebrati e anche per gli embrioni (pei quali è sempre usitatissimo) non lo credo niente affatto superiore al sublimato; tuttavia presenta una utilità: quella di rendere più teneri i tessuti fibrosi e connettivali, che col sublimato induriscono tanto da non poter essere tagliati al microtomo; anche la lente cristallina nelle fissazioni coll'acido picrico può essere facilmente tagliata. Ma accanto a questi vantaggi si deve porre un grande inconveniente: l'acido picrico per esser tolto dai tessuti esige dei ripetuti lavaggi nell'alcool, e quindi una spesa forte, e senza questa operazione i tessuti si colorerebbero poco bene. Come fissativo citologico l'acido picrico è pessimo; inoltre altera profondamente, gonfia ed anzi finisce col distruggere addirittura il tessuto connettivo.

Le indicazioni per l'uso sono le seguenti: prendere un volume rilevante, 50-100 volte quello del pezzo, di soluzione acquosa satura e lasciarvi l'oggetto per diverse ore, da 6 a 10. Poi passare *subito* nell'alcool forte, 80 ‰, che si cambia finchè non si vede più nell'alcool il color giallo, ciò che si ottiene in meno tempo se si rende il liquido leggermente alcalino con poche gocce di una soluzione di carbonato di litina 2 ‰. Si continua l'indurimento con alcool a 90 ‰ per alcuni giorni.

Non si devono mai lavare i pezzi fissati coll'acido picrico nell'acqua, ma *passarli subito* nell'alcool forte, 80-90 ‰.

Per ovviare agli inconvenienti dell'acido picrico solo, il VOM RATH ha proposto e raccomandato caldamente queste tre miscele:

1.<sup>o</sup> Soluzione satura acquosa di acido picrico 200 cc., acido osmico 2 ‰ 12 cc., acido acetico glaciale 1 cc. I pezzi vi si lasciano da mezz'ora a 48 ore, poi si trasportano nell'alcool 75 ‰ e poi, per brevissimo tempo, in quello assoluto.

2.<sup>o</sup> Soluzione satura acquosa di acido picrico 600 cc., acido osmico 1 g., cloruro di platino 3 g., acido acetico glaciale 3 cc. Od anche: soluzione satura acquosa di acido picrico 200 cc., acido osmico 2 ‰ 25 cc., cloruro di platino 1 g. sciolto in 10 di acqua e acido acetico glaciale 2 cc.

Volendo una soluzione più debole si mettono 12 soli cc. di soluzione osmica, invece di 25. La durata della fissazione varia anche qui

da un quarto d'ora a 24 ore. Il trattamento successivo da fare al pezzo può essere lo stesso che con il primo fissativo, oppure si può passare per breve tempo nell'alcool metilico e quindi per 12-24 ore nell'acido pirolegnoso del commercio; si risciacqua poi con dell'altro alcool metilico e si passa negli alcoli a 75 e 95 %<sub>0</sub>. Quest'ultimo dev'essere cambiato parecchie volte. Invece dell'acido pirolegnoso si può usare una soluzione di tannino al 20 %<sub>0</sub>. Adoperando l'acido pirolegnoso o il tannino si può tralasciare la colorazione, oppure si colorerà a lungo con safranina ed ematossilina.

3.<sup>o</sup> Soluzione satura acquosa di acido picrico 200 cc., cloruro di platino g. 1 sciolto in 10 cc. d'acqua, acido acetico glaciale 2 cc. Questo fissativo non differisce dal precedente che per la mancanza dell'acido osmico, e serve specialmente per quelle cellule che contengono grasso, vitello, secreto e che sarebbero di troppo abbrunite dall'acido osmico. I pezzi sono lasciati nel liquido fino a 24 ore, e poi messi nell'alcool a 75 e a 95 %<sub>0</sub>.

**30.** Una miscela di acqua distillata 100 cc., acido solforico concentrato 2 cc., acido picrico quanto se ne scioglie (circa 0,25 g.), dà l'acido **picro-solforico** e coll'aggiunta ad esso di 300 cc. d'acqua distillata si ottiene il **liquido del Kleinenberg**.

Quali e quante inesattezze abbiano fatto dire a chi ne fece uso questi due liquidi, che fissano poco, alterano, gonfiandolo, il tessuto connettivo e cambiano profondamente la struttura del citoplasma e del nucleo, diranno gli storici dell'istologia di questi ultimi trent'anni. E certo assai più ne avrebbero fatto commettere, se, per fortuna, l'azione dannosa del fissativo non fosse sempre stata diminuita dalla lunga permanenza dei pezzi nell'alcool forte. Eppure noi abbiamo visto pur ieri maestri insigni venire a parlare niente altro che di teorie sulla struttura del protoplasma, basandosi sopra osservazioni fatte con materiale fissato in acido picro-solforico! Eppure così poca importanza ha per molti la tecnica microscopica, che or ora leggiamo di un embrione umano giovanissimo sfortunatamente tenuto dalla donna per sei ore nell'acqua comune », messo sollecitamente a fissare nel liquido del KLEINENBERG! Non parliamo poi di chi ha preteso fare dell'embriologia fissando col liquido del KLEINENBERG e lavando con acqua <sup>1)</sup>.

**31. Acido osmico, ossia tetrossido di osmio.** — Cristalli vitrei, sostanza volatile di odore viroso e penetrantissimo, velenosa. Si scioglie nell'acqua e serve come fissativo la soluzione, od anche i vapori che da essa si sprigionano (e dai quali deve guardarsi chi lo adopra,

<sup>1)</sup> Gli stessi difetti del liquido del KLEINENBERG possono consigliarne l'uso in quei casi nei quali occorre appunto gonfiare il tessuto per renderlo più trasparente. Si veda più avanti nella parte speciale: *Embriologia*.



perchè irrita le mucose del naso e la congiuntiva). Costa caro, circa 4 lire al grammo, e viene mandato dentro tubetti di vetro saldati alla fiamma. Ecco come si procede per fare la soluzione:

Si prende una bottiglia a tappo smerigliato che chiuda molto bene, e la si risciacqua ripetutamente con acqua distillata, avvertendo che non vi penetri polvere organica, pulviscolo atmosferico, ecc. Poi si lava accuratamente all'esterno il tubetto contenente l'acido osmico cristallizzato e lo si pone dentro la bottiglia vuota, ma senza asciugarlo, per impedire che vi aderiscano fili di cotone, polvere o qualunque specie di materia organica. Si chiude la bottiglia col suo tappo e la si agita con colpi secchi e rapidi, finchè si rompe il sottile tubetto di vetro che contiene l'acido osmico, si versano nella bottiglia 100 cc. di acqua distillata e si torna a chiudere; dopo qualche ora i cristalli si saranno completamente disciolti. I frammenti di vetro possono esser lasciati nella bottiglia, perchè non danno noia. È inutile conservare questa soluzione all'oscuro, perchè, finchè non venga a contatto con della sostanza organica, non si ridurrà e si manterrà inalterata. È necessario che il tappo chiuda bene (se non chiude ermeticamente si metta della paraffina fusa intorno all'orlo) altrimenti la soluzione s'indebolisce con la continua perdita dei vapori di acido osmico.

Non si tocchi l'acido osmico con strumenti di metallo, perchè rimangono intaccati; ma si adoperino quelli di corno, d'osso o di vetro.

Questo reattivo è forse il più importante di quanti sono stati introdotti nella tecnica istologica; al suo impiego dobbiamo le prime conoscenze esatte sulla struttura del tessuto nervoso e degli organi dei sensi.

La ditta GRÜBLER & C. di Lipsia mette in vendita anche dei tubetti che contengono soltanto 0.1 g. di acido osmico. Così si possono avere delle soluzioni sempre fresche, facendole al momento con 10 cc. d'acqua distillata, se si vuole avere la soluzione all'1 %.

Certo l'acido osmico ha molti inconvenienti, penetra poco ed annerisce i tessuti, rendendo difficile la colorazione; oltre a ciò, da solo, altera la struttura nucleare rendendola omogenea.

Quindi è meglio adoperarlo mescolato all'acido acetico, che ne aumenta il potere penetrante, ed anche al sublimato corrosivo. Nelle notissime miscele del FLEMMING e dell'HERMANN l'acido osmico è unito con gli acidi cromico e acetico nella prima, e con cloruro di platino e acido acetico nella seconda.

Quanto all'annerimento esso potrà in parte giovare, perchè le sezioni possono essere osservate così senz'altra aggiunta di colore; del resto l'annerimento può essere tolto (vedi capitolo XIII), e quanto ai colori da impiegare si veda più avanti al capitolo che tratta appunto delle diverse sostanze coloranti.

Da solo l'acido osmico si usa in soluzioni all'1 % od anche al 2 %; ma credo in generale quest'ultima troppo forte; meglio stare alla prima, od anche qualchecosa meno, 0.75 %. Per fissare piccoli corpi sul portaoggetti, come protozoi, globuli sanguigni, ecc., sarà bene ricorrere ai vapori di acido osmico. E questa fissazione si fa molto facilmente, tenendo per alcuni minuti capovolto il portaoggetti, coi corpi da fissare, al disopra della bocca di un opportuno recipiente, nel quale si sia versata una piccola quantità di soluzione osmica.

La fissazione nella soluzione si fa in qualche ora (da 2 a 6), meglio tenendo i pezzi all'oscuro; e ricordando che questi devono essere di piccole dimensioni e tagliati, o per lo meno incisi, in modo che il liquido penetri facilmente all'interno, altrimenti la sola superficie rimane indurita e fissata.

La quantità di fissativo da adoperare può essere piccola, 5-6 volte il volume del pezzo; ma è necessario che il liquido sia stato conservato ben chiuso, e che anche il recipiente, nel quale il pezzo è posto a fissare, chiuda ermeticamente.

L'aggiunta di una piccola quantità di acido acetico alle soluzioni osmiche ne facilita la penetrazione; non si oltrepasserà mai un grammo di acido per 100 di soluzione osmica, ma anche 0,5 g. sarà quantità sufficiente.

Del resto l'acido osmico è il punto di partenza di diverse miscele fissative, specialmente di quelle citologiche, cioè adatte a fissare bene i piccoli pezzi di tessuto che devono servire per lo studio della struttura e della divisione cellulare. [Si ricordi che anche il sublimato acido può dare buoni risultati per lo studio della mitosi].

Una delle più note è quella che porta il nome del suo inventore, il FLEMMING; esiste una formula cosiddetta debole ed una forte, quest'ultima è più usata.

**32. Liquido del Flemming.** — Ecco le due formule:

debole	{	g.	0,25	Acido cromatico	0,75	g.	{ forte
		»	0,1	osmico	0,4		
			0,1	acetico glac.	0,5		
		100		Acqua distillata	100	»	

Sarà meglio preparare poca quantità di soluzione, che si terrà chiusa ermeticamente.

Siccome per gli usi comuni di laboratorio si tengono sempre pronte le soluzioni di acido osmico 1 %, di acido acetico 1 %, di acido cromatico 1 %, si può, volta per volta, preparare la miscela del FLEMMING di una forza *media* prendendo:

Acido cromatico	1 %	volumi	50
osmico	»	»	30
acetico			20

I pezzi da fissare devono essere piccoli (al disotto del mezzo centimetro di spessore), e, se si può, con dei tagli si deve facilitare la penetrazione del fissativo nell'interno del tessuto. La fissazione durerà da 6 a 24 ore, e potrà essere prolungata con vantaggio anche per 2 o 3 giorni. Non occorre tenere all'oscuro, ma il recipiente deve chiudere bene. Dopo fissato, il pezzo dev'essere lavato nell'acqua corrente per 12 ore almeno, e poi passato in alcool.

**33. Liquido dell'Hermann.** — All'acido cromico è sostituito il cloruro di platino; quindi, secondo le indicazioni da me date, si prepara così:

Cloruro platinico 1 ‰	volumi 50
Acido osmico 1 ‰	» 30
Acido acetico »	» 20

Per questa miscela, ritenuta ottima per lo studio della cariocinesi, e che è certamente uno dei migliori fissativi che possediamo, valgono le norme date per quella del FLEMMING. Cioè, si devono prendere pezzi di poco spessore; tenerli nel liquido per 24-48 ore od anche tre o più giorni; lavarli a lungo e ripetutamente nell'acqua prima di passare nell'alcool. Per scolorare i pezzi anneriti dalla fissazione colle miscele osmiche vedi il capitolo XIII.

**34. Acido acetico glaciale.** — È un liquido incolore, di odore di aceto spiccatissimo, e che coll'abbassarsi della temperatura cristallizza in lunghi aghi. Penetra molto facilmente nei tessuti e li rischiara, uccide istantaneamente gli elementi in stato di estensione; ma produce anche rapidamente delle alterazioni, perchè gonfia. Credo quindi che non sia mai da impiegare come fissativo nè da solo e neanche in grande quantità con altri corpi. Non consiglieri quindi di usarlo nè come fece il VAN BENEDEN (alcool assoluto e acido acetico glaciale parti eguali), nè come usava un tempo il CARNOY (alcool assoluto 3; acido acetico glaciale 1) e neanche com'è nella formula del MINGAZZINI, già riportata. Ritengo invece che l'acido acetico sia molto utile quando è mescolato con altre sostanze in piccole quantità da 0,5 a 2, tutt'al più 5 ‰.

Se poi si danno dei casi nei quali si reputa utile usare l'acido acetico in quantità rilevante, lo si userà solo per un tempo breve (al più mezz'ora) e dopo si metterà il pezzo in un fissativo senza acido acetico, e contenente molto alcool, non acqua.

**35.** Quanto all'altro fissativo del CARNOY e LEBRUN: Alcool assoluto 1, acido acetico glaciale 1, cloroformio 1, sublimato a saturazione <sup>1)</sup>; esso serve per un caso specialissimo e veniva impiegato

<sup>1)</sup> In *La Cellule*, 13. 1897, pag. 69. Io ho cercato di determinare approssimativamente il tenore di sublimato: esso è di 5 g. circa per 100 cc. di miscela.

per poco tempo (10'), e del resto non è un fissativo di uso generale <sup>1)</sup>.

Come regola generale, l'acido acetico dev'essere sempre tolto con cura dai tessuti, mediante lavaggi prolungati nell'alcool.

**36. Formol e formalina.** — Sotto questi due nomi, e più comunemente col secondo, è conosciuta una soluzione al 40 % di formaldeide nell'acqua. Introdotta pochi anni fa nella tecnica istologica fu dapprima molto vantata, ma sta in fatto ch'essa, in soluzione molto allungata (2-4 % di formalina del commercio), è soltanto un buon liquido preservativo per molti animali, specialmente per meduse, sifonofori, ecc., e quindi un liquido molto comodo e molto economico per una collezione da Museo. Ed anche per questo scopo non serve che per alcuni mesi, dopo è sempre necessario trasportare gli animali nell'alcool.

Come fissativo istologico è cattiva e quando si vogliono fare sezioni di animali e di organi conservati nella formalina (ma non da lungo tempo) è necessario passarli prima di tutto in un fissativo energetico e poi indurirli, disidratarli, ecc.; trattarli insomma come se fossero pezzi freschi <sup>2)</sup>.

**37.** Il LEE <sup>3)</sup>, che ha fatto delle esperienze sull'impiego in istologia delle soluzioni di formalina, assicura che questa sostanza altera profondamente la struttura del protoplasma, riducendolo colloide e producendo degli enormi vacuoli. Egli invece consiglia di sostituire la formalina all'acido osmico nelle soluzioni del FLEMMING e dell'HERMANN, perchè, a cagione del forte potere di penetrazione e del rapido indurimento, si possono avere in alcuni casi dei risultati migliori di quelli ottenuti con le soluzioni originali.

Ecco le sue formule:

FLEMMING — *Formalina.* — Formalina parti 1; acido cromico 1 % parti 2; acido acetico 4 cc. per ogni 100 cc. della soluzione.

HERMANN — *Formalina.* — Formalina parti 1; clorurò platinico 2 % parti 4; acido acetico 2 cc. per ogni 100 cc. della soluzione.

**38.** Il LAVDOWSKY (1894) raccomanda le miscele alcooliche; ecco una delle sue formule:

Formalina parti 5; acqua distillata parti 30; alcool 95 % parti 15; acido acetico glaciale parti 1.

<sup>1)</sup> L'ho trovato pessimo per il sistema nervoso centrale dei molluschi gasteropodi e lamellibranchi.

<sup>2)</sup> Con questa precauzione il prof. GRASSI dell'Università di Roma usa, come liquido preservativo, anche per materiale istologico, la formalina.

<sup>3)</sup> Op. cit., pag. 54.

*ALTRE FORMULE DI FISSATIVI*<sup>1)</sup>.

**39. Fissativo del Mueller.** — Bicromato potassico 2-2 1/2 g.; sale del Glauber (solfato sodico) 1 g.; acqua distillata 100 cc.

**40. Fissativo dell'Erlicki.** — Come il precedente, al posto del solfato di sodio si mette solfato di rame.

Tutti e due molto usati una volta come fissatori e induritori del sistema nervoso. Oggidì quasi abbandonati; come lo sono da soli: il *bicromato potassico*, l'*acido osmico* e l'*acido cromatico* che sono ancora impiegati in diverse miscele, già ricordate, e in altre che aggiungo qui sotto.

**41. Fissativo del Perény.** — Acido nitrico 10 % parti 4; alcool a 90% parti 3; acido cromatico 0,5 % parti 3. Usatissima, questa miscela, fino a poco tempo fa (anche dall'ERLANGER, per dimostrare la struttura alveolare del protoplasma!), consiste realmente di un alcool allungato con ossido di cromo e circa 5 % di acido nitrico, perchè l'acido cromatico, per l'azione di quello nitrico, si riduce ad ossido; il fissativo quindi è costituito da un alcool leggero, acidulato.

Tuttavia il liquido del PERÉNY, sopra tutto quando è freschissimo, è un buon fissatore, specialmente degli elementi glandulari. Esso è anche sempre molto usato in embriologia. Da ciò si può, mi pare, concludere che l'alcool a circa 50 % di forza, reso acido con circa 5 % di acido nitrico, è un liquido fissativo.

Il liquido del PERÉNY si lascia agire per diverse ore (6-24).

**42. Fissativo del Fol**<sup>2)</sup>. — Acido picrico in soluzione acquosa saturata vol. 10; acido cromatico 1 % vol. 25; acqua distillata vol. 65. Si rende più energico con 0,5 % di acido osmico; lavare con acqua calda, quasi bollente, poi passare in alcool.

**43. Fissativo del Merkel.** — Cloruro di platino g. 1; acido cromatico g. 1; acqua distillata 800. Agisce lentamente, dopo molte ore ed anche diversi giorni; è ritenuto un fissativo delicato e preciso.

Oggetti fissati con acido osmico tenuti in questa miscela per qualche ora non anneriscono più.

---

<sup>1)</sup> Ho riunito qui un elenco di molti fissativi che prendono il nome dal loro inventore, e che non sono compresi fra quelli menzionati più sopra. Non tutti sono importanti, anzi alcuni sono del tutto privi di valore; ma mi pareva necessario metterli qui come in un repertorio, perchè il lettore che trova il nome di qualcuno di essi in un libro, abbia modo di sapere come sono formati. Aggiungo che in generale è da evitare di chiamare un fissativo col nome dell'inventore, perchè spesso la stessa persona ha suggerito due o tre formule diverse.

<sup>2)</sup> Già accennato dal FLEMING due anni prima, nella sua classica opera (1882).

**44. Fissativo del Lang** (2.<sup>a</sup> formula). — Soluzione concentrata di sublimato nell'acido picrosolforico, si aggiunge 5 % di acido acetico.

**45. Fissativo del Foà.** — Parti uguali di soluzione satura acquosa (con 0,75 % di Na Cl) di sublimato e di liquido del Müller, oppure bicromato potassico 5 %.

**46. Fissativo del Kultschitzky**, 1887. — Quantità uguali di bicromato potassico e solfato di rame, bene polverizzate, sono sciolte a saturazione nell'alcool a 50 % e tenute all'oscuro per 24 ore. Al momento di servirsene, per ogni 100 cc. si aggiungono 5-6 gocce di acido acetico. La fissazione dei pezzi si fa all'oscuro per 12-24 ore; poi alcool forte.

**47. Fissativo del Kultschitzky**, 1897 <sup>1)</sup>. — Bicromato potassico 2 g., sublimato 0.25 g., acqua acidulata con 2 % di acido acetico 50 cc., alcool a 96 % cc. 50. Dopo 24 ore si filtra. Piccoli pezzi d'intestino di vertebrati si fissano per 4-6 giorni; poi alcool.

**48. Fissativo del Frenzel** (1886). — Alla soluzione satura di sublimato nell'alcool a 80 % si aggiunge altrettanto alcool, e poi, al momento di servirsene, 1 goccia di acido nitrico per ogni 1-2 cc. di liquido. Gli oggetti vi si lasciano per 5-10 minuti e si trasportano nella soluzione alcoolica di sublimato senza acido nitrico e quindi nell'alcool a 90 %.

**49. Fissativo del Fish** (1896). — Acqua 1 litro, acido picrico 1 g., sublimato 5 g., acido acetico glaciale 10 g.

**50. Fissativo del Boveri.** -- Soluzione satura acquosa di acido picrico 100 cc., di H<sup>2</sup>O 200 cc., di acido acetico glaciale 3 cc. Più semplicemente: H<sup>2</sup>O cc. 300, acido picrico 1. g., acido acetico glaciale 3 cc.

**51. Fissativo del Lugol.** — Acqua 100, joduro potassico 6, jodo 4. Buono per uccidere rapidamente, senza sformarli, gli spermatozoi.

**52. Fissativo dello Zenker.** — Si aggiunge 5 g. di sublimato e 5 g. di acido acetico glaciale a 100 cc. di liquido del MÜLLER. Si fissa per qualche ora, si lava con acqua e si trattano i pezzi, o le sezioni, con alcool jodato. Il RETTERER ha proposto recentemente <sup>2)</sup> delle modificazioni puerili.

**53. Fissativo del Rabl** (uno è stato già indicato al § 26). — Cloruro platinico 1 %, sublimato acquoso saturo <sup>3)</sup> e acqua distillata parti eguali. Successivamente l'ha modificato così: cloruro platinico 1 %

<sup>1)</sup> *Arch. Mikr. Anat.*, 49. 1897, pag. 7.

<sup>2)</sup> In *Journal Anat. Phys.*, Paris, 33. 1897, pag. 463.

<sup>3)</sup> Sarebbe riuscito più semplice e più chiaro se si fosse preso il disturbo di pesare i grammi di sublimato; così non sappiamo neanche di quale soluzione acquosa si tratta; con o senza sale? la differenza non è piccola. Ma purtroppo la tecnica istologica è fatta quasi sempre così all'ingrosso!

parti 1, sublimato acquoso saturo 2, acqua 2. Raccomandato per embrioni di vertebrati (soprattutto per stadi giovani).

**54. Acido picro-nitrico del Mayer.** — Acido nitrico 25 % parti 5, acqua 100, acido picrico a saturazione (meno di 1 g.). Sostituisce il picro-solforico con vantaggio quando si debba preparare qualche oggetto contenente carbonato di calce, perchè, invece di formarsi del solfato di calce insolubile e che resterebbe nei tessuti, si ha del nitrato di calce, solubile nell'acqua.

**55. Fissativo del Kollmann.** — Bicromato di potassio 5 g., acido cromico 2, acido nitrico 2, acqua 100 cc. Specialmente per uova di pesci.

**56. Fissativi del Lo Bianco.** — Acido cromico 1, acido acetico glaciale  $2\frac{1}{2}$ , acqua distillata 100. Per molti animali marini, specialmente salpe: acido cromico 1, acido acetico glaciale 5, acqua 100. Questa seconda soluzione, più acida, dà buoni risultati anche per la conservazione dei cefalopodi di grandi dimensioni che debbono servire per lo studio dell'anatomia macroscopica <sup>1)</sup>. Questi due liquidi, piuttosto che fissativi istologici, meritano di essere considerati come liquidi conservativi anatomici.

**57. Come si lavano i pezzi fissati.** — Questo dipende dal fissativo adoperato. *Acido osmico*: bisogna lavare per un paio d'ore con acqua distillata, cambiata 3-4 volte, per essere sicuri che tutto l'acido libero s'è disciolto; se rimanesse nei tessuti, essi continuerebbero ad annerire. Dall'acqua si passa all'alcool, e qui, se occorre, si scolorano. *Sublimato*: si lava con acqua distillata alla quale si è aggiunto 1 % di soluzione jodo-jodurata (§ 28) per 12-24 ore, poi si passa nell'alcool 70-80 % jodo-jodurato, e qui si lascia 24-48 e più ore, finchè il color giallo rimane. *Acido cromico* ed i suoi sali: il MAYER consiglia <sup>2)</sup> di tenere i pezzi per qualche ora al più nell'acqua distillata acidulata con 5 % di acido solforico o 2 % di acido nitrico; quindi si passa in acqua distillata e più negli alcoli. In questo modo la successiva colorazione diventa più facile. Dalle soluzioni nelle quali predomina l'alcool o l'acido acetico si passa nell'alcool forte. Dall'*acido picrico, picro-solforico, picro-nitrico, liquido Kleinenberg*, si passa *sempre* nell'alcool forte (80-90 %).

<sup>1)</sup> Nelle formule originali (*Mitth. Z. St. Neapel*, 9. 1890, pag. 443) LO BIANCO indica rispettivamente 5 e 10 di acido acetico concentrato; effettivamente l'acido era circa al 50 %; quindi è più esatta la mia formula.

<sup>2)</sup> In LEE-MAYER cit., pag. 29, nota.

### CAPITOLO III.

## Indurimento

**58. Generalità.** — Dopo quello che s'è detto a proposito dei fissativi, poco c'è da aggiungere in questo capitolo. O lo stesso liquido fissativo è un induritore, oppure per levarne l'eccesso dal pezzo si fanno i passaggi nell'alcool, e questo ha la proprietà di completare l'indurimento. Alla prima categoria appartengono l'acido cromico, i suoi sali e tutte le miscele che lo contengono; il liquido del MUELLER, del FLEMMING, dell'ERLICKI, ecc. Vi appartengono anche l'acido osmico ed i liquidi dei quali fa parte; così dicasi per il cloruro di platino, di palladio, ecc. Anche il sublimato indurisce i tessuti, azione che si continua poi per opera dell'alcool.

E quest'ultimo è l'agente induritore nelle miscele alcooliche acetiche, oppure quando lo si usa dopo la fissazione dell'acido picrico, picro-solforico, acetico, picro-acetico, ecc.

Puro liquido induritore è la formalina, in soluzioni dal 2 al 4 %; certi la usano fino al 10 %. Vedasi più avanti: sistema nervoso centrale.

**59. Acido cromico e suoi sali.** — L'acido da solo è ormai caduto in disuso, anche come induritore. Dei suoi sali era molto adoperato un tempo per il sistema nervoso centrale il *bicromato potassico* dal 2 al 5 %; anche questo è ormai poco usato. Molto in uso ancora è il *liquido del MUELLER* (bicromato potassico 2,5; solfato di sodio 1; acqua 100); molto meno il *bicromato d'ammoniaca* al 3 % ed il *liquido dell'ERLICKI* (Bicromato di potassio 2,5, solfato di rame 1, acqua 100). Il LEE (op. cit., pag. 59) ritiene quest'ultima miscela la migliore per l'indurimento di oggetti voluminosi.

Il *liquido del FLEMMING*, quello dell'HERMANN, quello del MERKEL, già citati, sono pure buoni induritori, oltre che fissativi.

Tutti questi composti agiscono con una certa lentezza e quindi i pezzi piccolissimi vi saranno tenuti per 24 ore, quelli voluminosi per una e più settimane; ed in quest'ultimo caso converrà tenere nell'inverno i pezzi entro un termostato a 30° C. circa.

Dopo induriti, si lavano a lungo con acqua corrente; per i piccolissimi pezzi occorrono 12-20 ore, per quelli molto grossi alcuni giorni.

Quando sono bene lavati, i pezzi si passano e si conservano nell'alcool a 70-80 %; ma questo dovrà essere cambiato non meno di due volte.

**60. Alcool.** — È uno dei migliori induritori; in esso si mettono i pezzi dopo tolti dal fissativo (sublimato, acido picrico ecc.), od anche



freschi. In quest'ultimo caso si comincia da un alcool molto allungato 50 % e dopo alcune ore, si passa successivamente in alcool a 70, 80, 90 %; per i pezzi già bene fissati si comincia subito con l'alcool a 70 od anche 80 %, poi si passa in quello a 90 %.

Quando l'indurimento è ottenuto, si possono conservare i pezzi nello stesso alcool a 90 %, od anche rimetterli in alcool a 70 %; ma se il materiale dev'essere adoperato per farne delle sezioni, occorrerà cambiare l'alcool a 90 % una o due volte; e poi passare i pezzi in quello a 95 %, e finalmente da quest'ultimo in quello assoluto.

Nell'alcool il materiale istologico può essere conservato senza danno (se la fissazione e l'indurimento furono fatti diligentemente) per alcuni mesi, non più. *È un errore, ripetuto in molti libri di tecnica, credere che i tessuti non soffrano dalla prolungata immersione nell'alcool; potranno dare ancora delle discrete sezioni per le ricerche di morfologia, di topografia; ma non già per quelle di citologia.* Per queste ultime il materiale non può essere conservato che in un solo modo: disidratato, rischiarato e imparaffinato.

**61. Formalina.** — Di poco valore come fissativo, questo liquido è il migliore, il più economico e il più rapido degli induritori. La formalina del commercio (ho già detto che è una soluzione acquosa al 40 % dell'aldeide formica) dev'essere allungata. Molte volte basta una soluzione al 2 %, o tutt'al più al 4 %; non credo consigliabile servirsi di soluzioni più concentrate. La formalina ha un odore viroso, che irrita, ma per poco tempo, le mucose, insudicia e indurisce la pelle; bisogna dunque evitare, per quanto è possibile, di tenervi immerse le dita.

Quando l'organo da indurire lo permette, si dovranno fare anche delle iniezioni. La soluzione di ormalina dev'essere cambiata una o due volte; essa scioglie il pigmento del sangue e molti altri pigmenti, come, per esempio, quello delle cellule nervose.

I pezzi tenuti in formalina mantengono bene la loro consistenza e il loro volume per qualche tempo; ma alla lunga si alterano profondamente nella struttura e quindi anche nell'aspetto esterno; così per esempio gli animali inferiori con tessuti molli e delicati finiscono con lo spappolarsi. Oltre a ciò la formalina gonfia molto.

La formalina ha il vantaggio di essere un liquido semplicissimo e molto economico per la conservazione preliminare del materiale, talvolta difficilissimo a preparare (per esempio meduse ed altri celerati); conservazione che, per periodi di qualche mese, è, si può dire, quasi ottima.

## CAPITOLO IV

## Colorazione. Colori del carminio e dell'ematossilina.

**62. Generalità.** — Con la fissazione e con l'indurimento i tessuti divengono atti ad essere tagliati in sezioni sottili, ma queste diventano così trasparenti che, chiuse nella glicerina o nel balsamo, od anche lasciate nell'acqua, sarebbero quasi invisibili, tolto il caso che nel liquido fissativo sia contenuto l'acido osmico, il quale ha la proprietà di colorare in grigio, in bruno ed in nero i vari elementi cellulari. Per poter distinguere in tutti i suoi particolari una sezione, occorre dunque colorarla, e questo si può fare con innumerevoli sostanze e con metodi disparatissimi. La colorazione è poi di grande importanza, perchè le differenti sostanze si comportano in generale diversamente con gli elementi o parti di essi, ed anzi lo stesso colore ha una assai differente elettività con le diverse sostanze organiche che formano le cellule. Il maggior numero dei colori sono dunque *elettivi*; pochi danno una colorazione diffusa.

Abbiamo così nella colorazione una delle parti più vaste e più complicate della tecnica istologica, perchè si connette quasi sempre con la chimica cellulare; ma bisogna dire anche per questa quel che s'è già detto per la fissazione: che la tecnica è ben lungi dall'aver delle basi razionali, e che in gran parte poggia sul più rozzo empirismo. Ciò premesso, si capisce subito come sia difficile dare delle indicazioni generali e precise; anzi come non si possa neanche fare una divisione scientifica delle diverse sostanze coloranti, basata sulla chimica. Una prima distinzione dobbiamo stabilire fra le sostanze coloranti che *impregnano* la cellula e quelle che la colorano veramente, *combinandosi* chimicamente con la sostanza organica cellulare. A queste seconde conserveremo il nome di sostanze coloranti, mentre le prime chiameremo sostanze d'impregnazione.

Le sostanze coloranti possono suddividersi empiricamente, secondo la loro origine, in colori organici, colori d'anilina e sali metallici. I colori organici sono il carminio e l'ematossilina. Quelli d'anilina possono essere acidi o basici, raramente neutri. Quanto al loro uso, in generale possiamo dire che i colori del carminio servono specialmente per la colorazione *in toto*, per quanto il carminio alluminico del GRENACHER ed il suo equivalente, il carmallume del MAYER, si prestino benissimo anche per le sezioni. I colori dell'ematossilina si prestano tanto per colorare il pezzo che le sezioni; quelli di anilina più specialmente per le sezioni, sebbene non sia esatto quello che alcuni trattati dicono che non si possa mai con essi tingere anche i pezzi *in toto*.

**63. Scelta della colorazione.** — Qui si presenta primo il quesito: si deve dare la preferenza alla colorazione di tutto il pezzo (*in toto*), o a quella sulle sezioni? Anche qui ci sono i partiti presi, e chi vorrebbe tingere sempre sulle sezioni, chi in massa; fra i primi troviamo la maggioranza degli anatomici, degli zoologi fra i secondi. E certamente, come sempre, anche in questo caso chi è esclusivista ha torto. Se si tratta di materiale comune, facilmente ottenibile; se si tratta di dover fare piuttosto delle ricerche di morfologia che di citologia; se il pezzo è facilmente permeabile ed omogeneo, tanto da poter conoscere presto il tempo che occorre perchè il colore lo penetri tutto; se, piuttosto che colori esclusivamente nucleari, si prestano allo scopo desiderato quelli che tingono anche il citoplasma e la membrana <sup>1)</sup>, e che non si voglia ricorrere alle doppie colorazioni; se la fissazione non è stata fatta con liquidi a base di acido osmico, il quale (con la eccezione dell'emallume e del carmallume del MAYER) non si presta per lasciar penetrare i colori, non capisco perchè non si debba dare la preferenza alla colorazione *in toto*. La quale ha il grandissimo vantaggio di esigere molto meno tempo e meno manipolazioni di quelle occorrenti per la colorazione delle sezioni. Infatti, se si colora con una tinta in soluzione alcoolica (carminio boracico, paracarminio, emacalcio, ecc.) basterà passare il pezzo (che è nell'alcool a 80 % a indurire) nella soluzione colorante; quindi lavarlo ripetutamente con alcool leggermente acidulato (0,1 % di HCl), se si reputa di averlo colorato troppo, e se si ritiene utile fissare specialmente il colore sui nuclei, altrimenti con semplice alcool a 80 %, e 90 %: fare poi la disidratazione, il rischiaramento, l'imparaffinamento (o il rivestimento in celloidina), tagliare le sezioni, attaccarle al vetro, levare la paraffina e chiudere il preparato nella resina.

Se invece si vogliono tingere le sezioni bisogna prima completare l'indurimento del pezzo, disidratarlo, rischiararlo, imparaffinarlo, tagliarlo; poi attaccare le sezioni al vetro, levare la paraffina con il xilolo o altro solvente; togliere il solvente con alcool assoluto, passare in un alcool debole, e quindi nell'acqua distillata, se si adopera un colore acquoso. Da questo nuovamente nell'acqua, poi nell'alcool, nel rischiarante e quindi si chiude nella resina. Come si vede, le operazioni sono più numerose, ed alcune anche noiose e non sempre di facile riuscita.

---

<sup>1)</sup> La mania della colorazione sulle sezioni l'ho vista portata all'ultimo eccesso in un laboratorio, dove gli esercizi agli studenti, per far loro conoscere i diversi tessuti, erano fatti con colorazioni sulle sezioni di colori d'anilina nucleari e col metodo regressivo. Di modo che gli studenti non vedevano, mai, in tutti i più diversi tessuti, altro che nuclei!

Tuttavia non v'è dubbio che in molti, in numerosissimi casi, la colorazione dev'essere fatta sulle sezioni. Si noti che talora, anche quando la colorazione delle sezioni è ritenuta necessaria, essa può farsi benissimo in tutto o in parte sul pezzo: e questo è vero anche per alcuni colori d'anilina e per le colorazioni doppie. Ma quando si disponga di scarso e raro materiale, quando il pezzo non è facilmente penetrabile, quando il grado di colorazione dev'essere sorvegliato per poterlo arrestare al punto desiderato, quando si tratti di ricerche più specialmente citologiche, quando il materiale è stato fissato con soluzioni osmiche, e non si voglia servirsi dell'emallume o del carmallume, quando sono necessari i colori di anilina, bisogna ricorrere alla colorazione delle sezioni. Finalmente vi sono alcuni metodi speciali importantissimi, che non sono possibili altro che sulle sezioni.

In conclusione: nessun esclusivismo; e servirsi di uno o dell'altro dei due metodi secondo le circostanze.

**64. Acquisto delle sostanze coloranti.** — Qui più che mai si tenga conto della raccomandazione già fatta per altri reagenti: non si acquistino colori in Italia e si ricorra sempre alle case estere, specialiste in questa materia. Io ho trovato, quasi sempre, ottimi i prodotti della casa GRÜBLER e C. di Lipsia. Oltre questa ditta il LEE raccomanda anche il MÜNDER di Gottinga e lo SQUIRE di Londra, ma di scienza mia non posso dirne niente. È necessario, anche facendo l'ordinazione al GRÜBLER, e specialmente se si tratta di qualche sostanza entrata di recente nella tecnica, di indicare, quando si fa l'ordinazione, la fonte e l'autore che trattano della materia, perchè il fornitore provveda esattamente quello che si desidera. Per i colori d'anilina si deve anche rammentare che lo stesso nome è stato dato a colori diversissimi; per esempio *verde luce*, ch'è il nome di un colore acido, ha servito per indicare il verde metile, ch'è tutt'altra cosa e fortemente basico.

Chi dubitasse delle mie raccomandazioni non ha che da fare a modo suo e provare ad acquistare le sostanze coloranti da qualche negoziante italiano; sarei felicissimo di potermi ricredere e di poter dichiarare che anche da noi questo ramo, difficile ma lucroso, di commercio è fatto da persona onesta non solo, ma capace e provvista delle necessarie conoscenze tecniche.

**65. Colori del carminio.** — Questo splendido e duraturo colore fu uno dei primi ad essere introdotto nella tecnica microscopica. Ora il suo uso è molto diminuito. Il MAYER ha dimostrato che la parte attiva della colorazione si deve alla combinazione dell'acido carminico con l'allume, e in piccola parte anche con la calce, e che sono del tutto inutili ed anche dannosi (sostanza organica) gli altri componenti del carminio. Tuttavia, benchè le formule del MAYER siano ra-

zionali, le tinte da lui composte non superano quelle del GRENACHER, ed io darò queste e quelle; tralasciando tutte le vecchie formule, che dovrebbero ormai scomparire dal tavolo dei microscopisti, come dalle pagine dei trattati di tecnica.

**66. Carminio alluminico.** — In una soluzione di 1-5 % di allume potassico (od anche di allume ammoniacco) si fa bollire del carminio puro in ragione di  $\frac{1}{2}$ -1 % per un quarto d'ora. Quando il liquido è freddo si filtra.

**67. Carmallume.** — In 200 cc. di acqua distillata si sciolgono a caldo 10 g. di allume potassico, quindi si aggiunge 1 g. di acido carminico. Si lascia deporre e si decanta, oppure si filtra. Si aggiunge qualche cristallo di timolo, oppure 0,5 % di salicilato sodico. (Gli oggetti da colorare col carmallume *non devono dare reazione alcalina*.)

Questi due colori acquosi sono ottimi, duraturi (non si alterano neanche dopo parecchi anni), danno colorazioni precise e delicate alle sezioni. Il carmallume è più penetrante, quindi può servire bene per la colorazione *in toto* (in questo caso s'intende che il pezzo indurito nell'alcool, dev'essere riportato nell'acqua distillata e tenutovi finchè vi affonda). Dopo colorato si lava nell'acqua distillata, se si vuole che rimanga tinto anche il plasma; se invece si desidera un puro colore nucleare si lava con acqua alluminata (1 %). In questo caso è necessario *lavare dopo ripetutamente* con acqua distillata, altrimenti nelle sezioni rimarranno dei cristalli di allume.

**68. Carminio boracico.** — Si sciolgono 4 g. di borace in 100 cc. di acqua distillata, si scalda, poi si aggiungono 2 g. di carminio, si mescola e si lascia riposare per due o tre giorni, rimescolando ogni tanto. Si aggiungono 100 g. di alcool 70-80 %, si agita e poi si lascia riposare per alcuni giorni, quindi si filtra.

**69. Paracarminio.** — In 200 cc. di alcool a 70 % si sciolgono 8 g. di cloruro di calcio, 1 g. di cloruro di alluminio e 2 g. di acido carminico. Si può sciogliere tanto a freddo che a caldo, poi si decanta o si filtra.

Queste due sostanze coloranti servono bene per tingere *in toto* i pezzi fissati col sublimato o con l'alcool, meno bene quelli con acido cromatico o con i suoi sali. I pezzi dall'alcool a 70-80 % si passano nel colore, e vi si lasciano per un tempo che varia molto, secondo il volume dell'oggetto, da qualche minuto fino a parecchie ore (12-20). Per dare un esempio, un pezzetto d'intestino di rana si colorerà in un'ora o poco più. Un pezzo di rene umano di un centimetro di lunghezza, due di larghezza e  $\frac{1}{2}$  di spessore sarà ben colorato dopo 3 ore. Questi due esempi valgono per materiale bene fissato in sublimato, poi tenuto per 48 ore in alcool iodato, poi per qualche giorno ancora in alcool puro a 80 %, cambiato un paio di volte.

Il carminio boracico è più brillante e forse anche più penetrante del paracarminio. Questo si presta meglio se si tratta di oggetti voluminosi e contenenti delle grandi cavità. Nel caso di oggetti voluminosi e sottili sarà bene adoperarlo allungato con 2-3 vol. di alcool. La stessa avvertenza si abbia per piccoli oggetti molto delicati. Non è male anche acidulare leggermente il paracarminio. Si avverta che gli oggetti da colorare con questa tinta *non* devono reagire alcalini, nè devono contenere molto calcare.

Tutti e due questi colori alcoolici sono di lunga durata e non si alterano per anni e anni. Il carminio boracico tinge di un rosso più vivo; il paracarminio tende al rosso vinoso. Quando non si voglia una colorazione diffusa, e specialmente per levare l'eccesso di colore, si passeranno i pezzi nell'alcool a 80 % acidulato con 0,5 % di HCl. Questo è necessario per il carminio boracico, ma utile anche per il para-carminio.

L'uno e l'altro sono colori poco buoni per le sezioni; volendo adoperarli a questo scopo, si allunghino con 3-4 volumi di alcool leggermente acidulato.

**70. Picrocarminio, o picro-carminato di ammoniaca.** — Questa era una sostanza colorante molto in voga un tempo, ma che perde di giorno in giorno terreno. Alle volte dà delle colorazioni brillanti e delicate, alle volte è molto incerta. Fu molto usata dal RANVIER, il quale la faceva con metodo del tutto empirico; altre formule furono indicate da molti altri, e recentemente il MAYER<sup>1)</sup> propose di sostituirla con un composto determinato: il picrocarminato di magnesia. Il colore, di preparazione un po' complessa, può essere acquistato da GRÜBLER e C. Agisce meglio e più rapidamente dei vecchi picrocarminati d'ammoniaca; le sezioni, per esempio, sono colorate in qualche minuto.

Tuttavia dovremo attendere qualche anno di esperienza per vedere se questa tinta basica merita di conservare un posto nella tecnica istologica.

**71. Colori dell'ematossilina.** — Questa sostanza (estratta dal legno campeggio) dà delle splendide e durature colorazioni in diverse gradazioni di blu violetto, quando la soluzione è neutra o leggermente alcalina; blu-rossastro quando la soluzione è acidulata. Il principio attivo dell'ematossilina è l'emateina combinata con l'allume; la soluzione colorante fatta con l'ematossilina si matura più o meno sotto l'azione dell'ossigeno e della luce, dopo un certo tempo. Invece le soluzioni dell'emateina servono appena preparate.

---

<sup>1)</sup> *Zeit. Wiss. Mikr.*, 14. 1897, pag. 25.

Tutte le soluzioni coloranti, finora note, fatte con l'ematossilina o con l'emateina, si alterano più o meno rapidamente; e tanto più presto quanto più sono esposte all'aria e alla luce. Filtrandole e cambian-dole ogni tanto di recipiente, ed aggiungendo delle piccole quantità di glicerina, durano più a lungo; ma si ha sempre una diminuzione nel loro potere colorante, specialmente con l'aggiunta della glicerina. È meglio fare le soluzioni in piccola quantità, adoperarle dopo qualche tempo (15-20 giorni), se sono fatte con l'ematossilina invece che con l'emateina, e servirsene per qualche mese; poi buttarle via e farne di nuove <sup>1)</sup>.

Quando si adoperano soluzioni concentrate, come l'emallume del MAYER, le sezioni sono colorate dopo 2-3 minuti; e se si vuole una colorazione più marcatamente nucleare si lavano con acqua distillata, alla quale sia aggiunto 1 % di allume, poi si lava con acqua distillata sola. Lavando con acqua di fonte rimane una colorazione leggera nel plasma, ma sempre molto più intensa nei nuclei. L'emallume è una buonissima sostanza anche per colorare *in toto*, ma bisogna guardarsi dal tingere troppo. Quindi è meglio adoprare soluzioni allungate con acqua alluminata 1 %, quando si tratta di tessuti delicati e di poco volume. I pezzi levati dall'alcool devono essere tenuti qualche tempo nell'acqua distillata, prima di venir messi nell'emallume.

I preparati chiusi nella glicerina darano poco. Quelli in balsamo sono permanenti, purchè il balsamo non sia acido, e purchè sia stato sciolto nel benzolo, xilolo o cloroformio; *non* già nell'olio di garofano o di bergamotto, o nella trementina.

Anche nel rischiarare le sezioni o il pezzo, prima dell'imparaffinamento, si dovrà evitare l'uso di questi olii.

Delle vecchie e numerose soluzioni di ematossilina, come quella del KLEINENBERG, del BÖHMER, di EHRLICH, di DELAFIELD, non è il caso di occuparsi, potendo essere tutte sostituite con vantaggio dal-

---

<sup>1)</sup> Per la teoria sui colori dell'ematossilina consulta: MAYER in *Mitth. Zool. St. Neapel*, 10. 1891, pag. 170, e UNNA in *Zeit. Wiss. Mikr.*, 10. 1892. pag. 483.

Un modo semplice ed economico di avere l'emateina è indicato dal MAYER. Un grammo di ematossilina si scioglie a caldo in 20 di acqua distillata, si raffredda, si decanta o si filtra, si aggiunge 1 cc. di ammoniaca (del peso specifico di 0,875) e si mette a seccare alla temperatura ordinaria in luogo asciutto, riguardato dalla polvere ed in un recipiente molto largo e basso (serve benissimo un cristallizzatore), in modo che lo strato liquido non arrivi a  $\frac{1}{2}$  cm. di altezza. L'acqua e l'ammoniaca evaporano, e rimane sul fondo una crosta che si stacca con una spatola di vetro o di porcellana o di platino (non di altro metallo). Si ha così una combinazione di emateina e ammoniaca che serve per fare le diverse soluzioni coloranti qui sopra ricordate. Questo metodo è economico, perchè da 1 g. di ematossilina si ricava egual peso, all'incirca, di emateina.

l'emallume o dall'emacalcio del MAYER, e dall'emateina I A, dell'APÀTHY.

**72. Emallume.** — In 100 cc. di acqua distillata si sciolgono riscaldando, 5 g. di allume e si aggiunge un decigrammo (0.1 g.) di emateina, che sarà stata polverizzata in un mortaio con qualche goccia di glicerina pura, neutra; dopo raffreddato, il liquido si filtra. L'emallume può adoperarsi subito; colora le sezioni, passate nell'acqua, in un paio di minuti. Quando la soluzione è invecchiata, sulle pareti del vaso e sulla superficie del liquido si vede un deposito; allora, invece di versare il colore con la bottiglia, sarà meglio prenderlo con una pipetta nel centro della massa.

L'emallume è uno splendido colore nettamente nucleare, quando dopo colorato si lava con acqua distillata alluminata; se si desidera che resti anche il colore sul plasma, si lava con acqua comune. Del resto si veda sopra (§ 71) sia per la lavatura che per la chiusura dei preparati.

Il MAYER (l. c.) consiglia anche di colorare con emallume acido (2 % di acido acetico glaciale) poi lavare a lungo le sezioni con acqua potabile. Ed io raccomando di adoperare di preferenza l'emallume allungato (da 2 a 20 volumi) con acqua distillata per avere colorazioni delicate.

**73. Emateina I A** di APÀTHY <sup>1)</sup>. — Si sciolgono in 100 cc. di acqua distillata 9 g. di allume e si aggiunge: acido acetico glaciale 3 g., acido salicilico 0,1 g.: si unisce con 100 cc. di glicerina pura e con 100 cc. di tintura di emateina all'1 %. Questa è ottenuta col lasciare un grammo di ematosilina in 100 cc. di alcool a 70 %, alla temperatura dell'ambiente, per 6-8 settimane; la bottiglia che la contiene deve essere di un volume almeno della metà maggiore, perchè sopra al liquido rimanga una certa quantità di aria, che facilita il maturarsi dell'ematosilina. Sarà bene anche, di tanto in tanto, levare il tappo ed agitare un poco il liquido.

La soluzione si conserva inalterata per degli anni. Il colore non è esclusivamente nucleare, e all'APÀTHY ha servito specialmente per mettere in evidenza le fibrille elementari del tessuto nervoso, ma può servire per usi generali, dando una colorazione molto bella e delicata, tanto sulle sezioni che sui pezzi *in toto*.

**74. Emacalcio del Mayer.** — A 5 g. di cloruro di calcio, 0,1 g. di cloruro di alluminio, 1 g. di acido acetico glaciale e 0,1 g. di emateina, si aggiunge 60 cc. di alcool a 70 %. Il cloruro di calcio dev'essere messo per ultimo nella soluzione.

---

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1897, pag. 712.



Questo colore ha lo scopo di sostituire le soluzioni alcooliche acide di ematossilina, ma, come quelle, non è di lunga durata e colora meno dell'emallume.

La colorazione che si ottiene è rossa, ma lavando a lungo con alcool a 70 % neutro, il colore virerà al blu violetto, e se non lo facesse basterà lavare con alcool contenente 2 % di cloruro di alluminio. Gli oggetti da colorare non devono reagire alcalini. L'emacalcio sarà utile in quei casi nei quali non si può impiegare un colore acquoso.

**75. Ematossilina ferrica**, secondo M. HEIDENHAIN <sup>1)</sup>. — Questo metodo di colorazione, facile e di splendido effetto, non è da consigliare ai principianti, perchè, come tutti i metodi speciali, può indurre molto facilmente in errore gli inesperti. Sezioni di pezzi fissati in sublimato, o in alcool, od anche nel liquido del Flemming, sono trattate con allume di ferro al 2,5 % per 6-12 ore. Il sale di ferro deve essere in cristalli violetti, non verdi. Si lava con acqua distillata, e si passa nella soluzione di ematossilina (ematossilina g. 1, alcool a 90 % 10 cc., acqua distillata 90 cc.) che dev'essere preparata da non meno di 4 settimane. Si lascia colorare per 24 ore, si lava nell'acqua distillata e poi si scolora con lo stesso allume ferrico, e si sorveglia l'operazione, esaminando ogni tanto il preparato al microscopio; si deve lavare con cura perchè non resti allume nelle sezioni, quindi si passa nell'alcool assoluto, nel xilolo (o nel benzolo, non negli olii eterei, e si chiude nel balsamo.

L'HEIDENHAIN insiste nel ritenere necessario che le sezioni siano di 6  $\mu$  al più, meglio ancora di 3  $\mu$  soli; ciò non è generalmente accettato, ma certamente si hanno migliori risultati con quelle sottili. Le sezioni saranno attaccate al vetro con l'acqua distillata. Se lo scoloramento, come pure la precedente colorazione, sono stati prolungati, nel preparato si vedranno soltanto d'un colore violetto quasi nero: la sostanza cromatica, i nucleoli, il così detto centrosoma e alcuni altri corpuscoli, detti corpi siderofili. Tutto il rimanente resta d'un tono grigio chiaro e volendo si può ricorrere ad una doppia colorazione col Bordeaux R; per la colorazione plasmatica precedente all'ematossilina vedi Capitolo XXIII.

CARNOY e LEBRUN, che hanno adoprato questo metodo nel recente lavoro sulla fecondazione dell'*Ascaris megalocophala* <sup>2)</sup>, lasciavano le sezioni, anche grosse, fatte con la celloidina, nel mordente (allume ferrico al 2  $\frac{1}{2}$  %) per 24 ore, poi lavavano nell'acqua corrente e passa-

<sup>1)</sup> In *Festschr. Kölliker*, Leipzig 1892, pag. 118; *Zeit. Wiss. Mikr.*, 9. 1892, pag. 204. e *ibid.*, 13. 1896, pag. 186.

<sup>2)</sup> *La Cellule*, 13. 1897, pag. 63.

vano nell'ematossilina per altre 24 ore; scoloravano con prudenza per un quarto d'ora circa, finchè le sezioni messe nell'acqua facevano vedere l'uovo tinto in giallastro e gli elementi del nucleo neri; lavavano a lungo, da mezz'ora a un'ora, nell'acqua. La fissazione dei pezzi di ovario era fatta col fissativo già ricordato (vedi § 35). I preparati così ottenuti, e che ho avuto occasione di vedere, sono di una chiarezza e di una bellezza non comuni, e certamente superiori ai disegni del BOVERI.

Per sorvegliare meglio la scolorazione si può adoperare una soluzione di allume ferrico più allungata di quella che serve per mordente; così per esempio una all'1 % od anche a 0,5 %.

## CAPITOLO V

### Colorazione. Colori di anilina.

**76. Generalità.** — Danno colorazioni splendide, ma non sempre durature; alcune si possono dire quasi permanenti, per lo meno si offuscano assai lentamente, solo dopo alcuni anni; altre hanno una brevissima durata. In generale si mantengono di più lasciando i preparati all'oscuro; quello che importa è di chiuderli con balsamo perfettamente neutro, come quello che, solo da pochissimo tempo, mette in commercio il GRÜBLER. Non si possono mai conservare nei mezzi acquosi.

I colori d'anilina sono numerosi, troppo numerosi, e ci danno tutta la gamma dei colori, dalle tinte più sfacciate fino al nero; e, con tanta abbondanza, si capisce che molti si siano divertiti a mettere insieme delle doppie o triple colorazioni, parecchie delle quali sono di una utilità problematica.

Talvolta i più diversi colori d'anilina hanno lo stesso nome, come pure si dà il caso che la stessa sostanza abbia nomi diversi; quindi sono facilissime le confusioni. Si deve anche ricordare che è difficile avere dei colori d'anilina proprio puri; pare anzi che qualcuno non lo sia mai (per esempio il verde metile contiene sempre tracce di violetto di metile); perciò bisognerà ricorrere alle migliori fabbriche, e non potendo far questo per piccoli acquisti, servirsi di un negoziante al dettaglio, sulla capacità e onestà del quale si possa contare. Infine devo menzionare, che in qualche caso particolare l'autore di una data colorazione ha dichiarato di aver ottenuto l'effetto desiderato *soltanto* con colori di una *data* fabbrica, e non con eguali colori provenienti da fabbrica diversa. In questi casi, del resto non frequenti, nel fare l'ordinazione si dovrà indicare l'autore del me-

todo, la Rivista che l'ha stampato o almeno il nome preciso del fabbricante

I colori di anilina servono specialmente per le sezioni, ma possono talvolta dare buoni risultati anche sui pezzi *in toto*.

Avendo detto che i colori d'anilina sono molto numerosi, e che quindi si sono fatte numerosissime combinazioni di essi, non intendo parlare di tutti e descriverle tutte; tutt'altro, e mi limiterò ai colori più importanti ed alle colorazioni che hanno uno scopo utile. Vorrei consigliare il principiante di non perdere il tempo nel fare tanti tentativi su colori secondari e con combinazioni inutili; ma so per pratica quanto il consiglio sia vano.

**77. Divisione dei colori.** — La sola razionale sarebbe quella chimica, proposta già dall'EHRlich nel 1880; e quindi dividere i colori di anilina in basici, neutri e acidi. E i primi dovrebbero corrispondere alle colorazioni prettamente nucleari, mentre quelli acidi colorerebbero di preferenza il plasma. Quanto ai colori neutri, passano in seconda linea; ma in realtà la divisione chimica non corrisponde alla differenza di colorazione che in pochi casi determinati, e molto spesso lo stesso colore può, essendo acido, colorare anche la cromatina del nucleo, o il plasma, essendo basico. Queste differenze dipendono dal modo diverso di comportarsi delle diverse parti della cellula in conseguenza dei tanti trattamenti con le più svariate sostanze, fatti dalla fissazione del tessuto in poi, e in secondo luogo anche dal modo col quale si fa la colorazione.

Questa può essere *progressiva* o *diretta*, oppure *regressiva* o *indiretta*. La prima, certamente più razionale, consiste nel colorare, arrestare la colorazione al punto voluto, lavare con acqua e chiudere il preparato. A questo genere appartiene, per esempio, la solita colorazione col carmallume o coll'emallume. Nel secondo caso tutta la sezione è sopracolorata e dopo si procede a una decolorazione, la quale comincia prima in certe parti della cellula per poi farsi sentire via via sulle altre; allora si tratta di arrestare la *regressione* al punto desiderato per avere colorate certe parti e scolorate certe altre. La colorazione coll'ematosilina ferrica (vedi § 75) è un esempio di colorazione regressiva, o indiretta. È evidente che questa seconda è irrazionale; ma siccome, alla fine, dà dei risultati utili, così è sempre in uso.

Ora, nella colorazione con colori d'anilina, il metodo regressivo è molto più adoperato del primo; ne avviene che tanto più difficilmente abbiamo una corrispondenza fra il comportamento chimico, che è proprio del colore, e quello che quest'ultimo ha sulle diverse parti della cellula.

Una tendenza moderna, per avere anche con i colori di anilina (del resto così pure con quelli dell'ematosilina) una colorazione

elettiva, è di procedere alla colorazione progressiva mediante soluzioni molto allungate, che si fanno agire per lungo tempo (12-24 ore). In questo modo l'elettività della tinta può esplicarsi con maggiore determinatezza, e diventa così inutile il ricorrere al metodo regressivo.

Fra i colori basici più importanti abbiamo: la saffranina, il verde di metile, il blu di metilene, la fucsina basica, la tionina, il violetto di Genziana.

Fra gli acidi: l'eosina, la fucsina acida (Rubin S) e l'orange G, secondo il FLEMMING <sup>1)</sup>.

**78. Come si usano i colori d'anilina.** — Ho già detto sulle sezioni, e, devo aggiungere, nel maggior numero dei casi sulle sezioni fissate con liquidi osmici (liquido del FLEMMING, dell'HERMANN, ecc.); ma anche i pezzi fissati con soluzioni contenenti sublimato si colorano talora benissimo.

Per avere buone colorazioni si devono avere sezioni piuttosto sottili, al disotto dei 10  $\mu$ , meglio sotto ai 7  $\mu$ . Si colora per pochi minuti o anche per molte ore, talvolta per 2-3 giorni; si toglie facilmente l'eccesso di colore con alcool, specialmente se allungato con acqua e leggermente acidulato. Per esempio, la fucsina acida resiste bene se si lava con alcool assoluto, se ne va rapidamente con alcool a 70-80 %. Quando l'alcool è acidulato, bisogna che lo sia leggermente, per esempio 0,1 % di HCl concentrato è troppo forte, e allora bisogna sorvegliare attentamente la scolorazione. Meglio di tutto allungare quell'alcool acidulato con 1 od anche 2 di alcool neutro. Anche l'olio di anilina serve molto bene (unito con alcool forte), in certi casi, per la regressione del colore. Qualche colore regge talvolta così poco che è necessario, invece di levarlo, fare la lavatura con dell'alcool nel quale se ne è sciolto in piccola quantità: questo è il caso, per esempio, dell'eosina. E a questo proposito è bene avvertire che i colori così instabili sono quelli che danno in generale le colorazioni meno precise.

Va notato che i colori nucleari si comportano diversamente con i nuclei in riposo e con quelli in mitosi. I cromosomi di questi ultimi trattengono molto di più il colore dei primi; quindi nel metodo regressivo, quando i nuclei in riposo sono già del tutto scolorati, quelli in mitosi si mostrano tinti ancora distintamente. La spiegazione probabile è che nei nuclei in mitosi abbiamo la cromatina quasi esclusivamente formata da acido nucleico (o nucleinico), e quindi il colore basico si combina saldamente.

---

<sup>1)</sup> Invece il MAYER (LEE e MAYER, pag. 189, nota) dice che l'orange G, quando è puro, non è acido.

La scolorazione con l'alcool acido si fa rapidamente, di solito in un minuto. Vedremo più sotto che il jodo e l'acido cromatico, per una loro proprietà non bene conosciuta, agiscono come fissatori della tinta sulla cromatina, e sono quindi in alcuni metodi (GRAM, BIZZAZERO, HEIDENHAIN) adoperati a questo scopo.

Dopo scolorate con l'alcool acido, si passano le sezioni nell'alcool assoluto, e, in quei casi in cui la scolorazione non è necessaria, si deve dall'acqua passare direttamente all'alcool assoluto. Per rischiarare non si può usare di solito l'olio di garofano perchè estrae rapidamente il colore; si useranno quindi gli altri oli, oppure il xilolo, il benzolo, ecc. Se si è adoperato l'olio di garofano o l'olio di anilina bisogna allontanarli col xilolo e poi chiudere nella resina sciolta in xilolo o benzolo, *non* in cloroformio.

#### a) COLORI BASICI.

**79. Saffranina** <sup>1)</sup>. — È uno dei più belli fra i colori d'anilina, ed anche fra i più resistenti; colora in rosso. Bisogna averla di qualità buona (ve ne sono oltre venti sorta diverse). In generale la soluzione si fa nel liquido semi acquoso o semi alcoolico, oppure nell'acqua di anilina. Due formule molto usate sono le seguenti:

1.<sup>o</sup> Saffranina 1 g., Alcool assoluto 100 cc., Acqua distillata 200 (PFITZNER). È appena necessario far osservare che è del tutto inutile sciupare 100 g. di alcool assoluto quando poi si deve aggiungere 200 di acqua; e si avrà una soluzione identica adoperando un poco più di alcool a 90-95 %.

2.<sup>o</sup> Saffranina 1 g. Acqua di anilina 200 cc.; oppure, meglio, si unisce una soluzione alcoolica concentrata di saffranina con egual volume d'acqua d'anilina (scuotere a lungo e poi filtrare).

La soluzione non dura inalterata lungo tempo, e converrà rinnovarla ogni due o tre mesi. Specialmente usata dal FLEMMING per le sue ricerche sulla divisione nucleare, la saffranina era da lui adoperata sulle sezioni di materiale fissato a lungo (12 ore almeno) nel suo liquido fissativo più forte, e le sezioni venivano colorate per qualche ora di seguito, quindi trattate con alcool acidulato, alcool assoluto, poi rischiarate e chiuse nel balsamo. Anche con la fissazione in sublimato si possono avere delle buone colorazioni con la saffranina; ma questa deve agire a lungo, per 10-20 ore.

---

<sup>1)</sup> *Safranina*, scrivono tutti gli autori italiani, nei quali ho trovato questa parola, ma evidentemente errano; Zafferano. Safferano, noi diciamo: quindi il tedesco *Safranin* va tradotto *Saffranina*.

**80. Violetto di Genziana.** — Un tempo molto più in uso d'adesso, questo colore, impiegato anche nella tecnica batteriologica, si prepara secondo la formula di EHRLICH: violetto di genziana g. 1, olio, di anilina g. 3, alcool a 90 % cc. 15, acqua distillata 80. Le sezioni, specialmente di materiale fissato con le miscele osmiehe, od anche con l'alcool assoluto, si colorano per un tempo variabilissimo (da mezz'ora a dieci o dodici ore). Si differenzia, come la safranina, o nell'alcool neutro o in quello leggermente acidulato.

È stato suggerito, dopo lavate rapidamente con alcool le sezioni colorate, di trattarle con soluzioni acquose di acido cromico 0,1 % (BIZZOZERO), oppure con la miscela: jodo g. 1, joduro potassico 2 g., acqua distillata 300 g. (GRAM), per differenziare meglio la colorazione nucleare <sup>1)</sup>.

Il colore non è così duraturo come la safranina, tuttavia il LEE assicura di avere ancora in buonissimo stato preparati fatti da molti anni, chiusi nella colofonia sciolta con trementina, e tenuti al riparo dalla luce.

**81. Blu di metilene.** — Molto usato per la colorazione speciale del sistema nervoso periferico (vedi capitolo XXIV), è inutile parlarne qui, tanto più che negli usi generali è sostituito con vantaggio dalla tionina.

Sarà bene avvertire subito che *non* è vero che il blu di metilene colora i tessuti o gli elementi viventi, ma invece colora prima quelli che muoiono prima, e la colorazione vien messa in evidenza, non già dalla presenza dell'ossigeno, ma (come l'APATHY ha dimostrato) da quella di tracce di ammoniaca.

**82. Tionina.** — È un altro azzurro, vicino al precedente; colora intensamente e in pochi minuti le sezioni di pezzi fissati in sublimato; si usa la soluzione acquosa satura e si colora per 5-15 minuti, si lava con acqua distillata e si scolora a lungo, per qualche minuto, con olio di anilina parti 1, alcool 95 % parti 9: si lava ripetutamente con alcool assoluto, si rischiarà con xilolo e si chiude in balsamo-xilolo (vedi capitolo XXIV, metodo NISSL). Le sezioni di pezzi fissati col liquido del FLEMMING si colorano dopo qualche ora.

Facile da adoprarsi, questo colore è specialmente da raccomandare ai principianti.

<sup>1)</sup> In tutti i Manuali si trova riportato il metodo dato dal BIZZOZERO, e che precisamente dice così: dopo colorato e lavato per 5'' nell'alcool assoluto si tratta per 2' col liquido del GRAM (vedi sopra), si lava ancora con l'alcool assoluto per 20'', si mette per 30'' nella soluzione di acido cromico 0,1 %. altri 20'' nell'alcool assoluto, altri 30'' nell'acido cromico, ancora 30'' nell'alcool assoluto, si scolora, si rischiarà con olio di garofano e si chiude. Occorre far rilevare che questo complicato procedimento non ha ragion d'essere?

**83.** Metto in seconda linea parecchi altri colori, quali la fucsina basica, il violetto di metile, il blu Vittoria, la Dahlia, ecc., dei quali non mette conto parlare.

**84. Verde di metile**, chiamato anche verde luce (Vert lumière, Lichtgrün), benchè questo nome appartenga realmente ad un colore acido; non deve essere poi confuso con diversi altri colori verdi (Verde Jodo, Verde Eusebio, Verde di Parigi, ecc.).

Il verde di metile, *Metil verde 00*, è il doppio clorometilato di zinco e di exametilpararosanilincoloridrato, ottenuto facendo agire il cloruro di metile sul metile violetto, perciò si trova frequentissimamente impuro, con qualche traccia di violetto<sup>1)</sup>.

È senza dubbio uno dei più importanti colori d'anilina; con pochissimi altri, ha in grado eminente la proprietà di essere un colore esclusivamente nucleare; sensibilissimo verso le sostanze alcaline *deve essere sempre adoperato in soluzione acida*. Può essere combinato senza precipitare, con parecchie sostanze, e così ne fece largo uso il CARNOY, per preparati a fresco conservati in liquidi. Solubilissimo nell'alcool assoluto, talvolta non resiste ai lavaggi fatti con quest'ultimo, che per breve tempo. Si deve tener conto di questo fatto, perchè altrimenti, quando si chiudono in balsamo le sezioni colorate con l'importantissima triplice colorazione BIONDI-HEIDENHAIN, il verde di metile se ne va. Bisogna dunque fare rapidamente la disidratazione. Del resto, si possono chiudere i preparati nella glicerina o nella gelatina glicerina, ma purchè queste sostanze reagiscano neutre o leggermente acide. Alle lavature con l'alcool assoluto resiste meglio se, dopo colorate, si tengono le sezioni per 10-15 minuti nella tintura di jodo (HEIDENHAIN, op. cit., p. 117). Lo stesso risultato si ottiene lavando dopo colorato con acqua distillata, o con acqua 3 e glicerina 1.

Non è del tutto esatta l'asserzione del LEE<sup>2)</sup> che il verde di metile colora esclusivamente la cromatina, perchè anche la membrana nucleare rimane spesso colorata nei tessuti fissati con sublimato. Lo stesso dicasi del muco. Certo è che ha una speciale elettività per la cromatina, propriamente detta, cioè per la nucleina, perchè nelle cellule nervose, ad esempio, lascia scolorata la paranucleina del nucleolo mentre colora le zolle basofile (di nucleina) che lo circondano. Questo fatto, dimostrato per la prima volta dal LEVI, ha un valore

---

<sup>1)</sup> Il MAYER (*Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1896, pag. 312) ha insegnato un modo semplicissimo per constatare la presenza del metilvioletto. Una goccia di metilverde è messa su della carta da filtro e la macchia è esposta ai vapori di ammoniaca; se non c'è impurità, deve dileguare senza dare colore violetto.

<sup>2)</sup> *Vademecum*, IV ediz., pag. 198; ma il MAYER (pag. 174) prudentemente traduce *kern*.

generale per tutti i vertebrati, ed io ne ebbi la conferma anche per i molluschi.

Il verde di metile si adopera in soluzione acquosa 1:100, leggermente acidulata con acido acetico; ma il suo uso principale è in qualità di colore basico nella sopraricordata miscela BIONDI-HEIDENHAIN (vedi § 92).

### b) COLORI ACIDI.

**85. Eosina.** — Ve ne sono diverse, alcune solubili in acqua distillata, altre nell'alcool. Danno sempre una colorazione diffusa, e perciò l'eosina è adoperata come colore di contrasto dopo, o con, una colorazione nucleare blu o violetta; ma oggidì è molto meno usata di un tempo. Serve per lo studio di certi grauli contenuti nelle cellule (vedi § 100) e nei globuli di sangue. Se ne fa una soluzione all'1 %, od anche 1 a 200; essendo solubilissima nell'alcool, sarà bene fare le disidratazioni delle sezioni con dell'alcool assoluto al quale sia aggiunta una piccola quantità di eosina in polvere.

**86. Fucsina acida (Rubin S).** — È uno dei migliori fra i colori acidi; dà una bellissima colorazione rossa di contrasto dopo (o con) una colorazione nucleare verde, blu o violetta. Quindi è specialmente indicato nelle doppie colorazioni col metilverde, coll'emalume, col blu di metilene, ecc. Colore molto intenso, se ne fa una soluzione nell'acqua al mezzo per cento o anche meno. Non è male aggiungere qualche cristallo di acido fenico. Si usa principalmente nelle doppie e triple colorazioni dell'EHRlich, BIONDI, ecc. (vedi capitolo seguente).

**87. Orange G.** — Di nessuna importanza da solo, lo ricordo come componente la miscela del BIONDI, ecc.

**88. Verde luce (LICHTGRÜN).** — Da non confondersi col verde di metile (vedi § 84). Solubile in acqua ed in alcool; ottimo per una colorazione plasmatica di contrasto, dopo una colorazione nucleare rossa, come per esempio la saffranina.

**89. Verde-jodo, malachite verde, ecc.;** tutte le aniline blu, l'acqua blu, i metili blu (da non confondersi col blu di metilene), ecc., ecc., non meritano speciale menzione.

Altri colori usati, di non molta importanza e che non sono derivati dall'anilina, rammenterò qui. **Kernschwarz**, un tannato di ferro ottenuto in modo sconosciuto e adoperato in Russia; viene venduto dal GRÜBLER. Il LEE raccomanda molto il *kernschwarz*, come un colore plasmatico, per le sezioni di materiale fissato nelle soluzioni osmiche (non in sublimato). La colorazione plasmatica deve precedere quella nucleare. Se il materiale è fresco, la colorazione succede in pochi minuti, anche allungando la soluzione con 10 vol. d'acqua. Con materiale vecchio occorrono 24 ore, con la soluzione non allungata. Si lava in acqua, e dopo si tinge, per altre 24 ore, con una colorazione nucleare (saffranina, emateina, ecc.).



**90. Orceina**, non orcina; colore che ha le proprietà riunite di una tinta basica e acida nello stesso tempo. Poco importante di per sè, serve per una doppia colorazione del tessuto connettivo (fibre elastiche); vedi capitolo XXIII.

## CAPITOLO VI.

### Colorazioni doppie e triple.

**91. Generalità.** — Come ho già detto, in questo campo s'è sbizzarrita la fantasia di mille autori: e tutte le combinazioni possibili furono escogitate. Il maggior numero di esse sono inutili, od hanno tutt'al più uno scopo dimostrativo scolastico, per dare una differenza di tinta fra i diversi elementi di un tessuto ed anche fra i diversi tessuti di un organo. Di reale importanza sono invece quelle doppie colorazioni che si propongono di mettere in evidenza delle differenze nella costituzione chimica, e che sono quindi formate da un colore basico (nucleare) e da uno acido (plasmatico). Importante fra tutte è quella che prende il nome di

**92. Miscela Ehrlich-Biondi-Heidenhain.** — Consta di 100 cc. di soluzione satura di Orange G, 20 cc. di una soluzione satura di fucsina acida (Rubin S) e 50 cc. di una soluzione concentrata di verde metile. La miscela si allunga con 60-100 volumi di acqua. Non volendo prepararla da sè, si può comperare la polvere dal GRÜBLER; 1 g. di questa si allunga con 60-80 cc. d'acqua distillata e poi si aggiungono 7 cc. di una soluzione 0.5 % di fucsina acida nell'acqua distillata. Questa soluzione madre non dev'essere impiegata così concentrata (in questo caso le sezioni sarebbero colorate in due minuti); ma bensì allungandola molto. Oltre a ciò bisogna servirsene solo con materiale fissato nel sublimato acquoso, o nel sublimato con acido acetico. I pezzi devono essere stati fissati e imparaffinati da non molto tempo. La colorazione riesce bene quando la fissazione nel sublimato non è stata prolungata per molto tempo, 2-3 ore. Meglio se le sezioni sono sottili, ma ciò non è necessario. Se queste avvertenze saranno scrupolosamente osservate si potranno avere buoni risultati ed una colorazione delicata e precisa.

La soluzione allungata si prepara in questo modo: 1 cc. di soluzione madre, 2,5 cc. di acido acetico 1 %, 150 cc. di acqua distillata. Le sezioni attaccate al vetro con l'acqua distillata saranno tenute prima per 2 ore in una soluzione acida (acido acetico glaciale 1 g., acqua 500 cc.); ma questo bagno non è necessario. Poi si colorano per 18-24 ore, si lavano nell'acqua distillata (SQUIRE), oppure si trattano per 10-15 minuti con della tintura di jodo (HEIDENHAIN),

o, secondo quello che ho trovato io, meglio, con: acqua 3 vol., glicerina 1 vol. In questo modo si fissa il verde metile e si toglie l'eccesso di fucsina acida. Si sgocciola, e si leva quanto più si può l'acqua avvicinando all'orlo del vetrino della carta bibula, poi si passa *direttamente* nell'alcool assoluto; due rapidi passaggi, poi si rischiara con xilolo e si chiude in balsamo-xilolo. E si può chiudere anche in un mezzo acquoso leggermente acidulato.

Se le sezioni sono tenute troppo nell'alcool assoluto il verde di metile se ne va facilmente. I preparati non durano molto; tuttavia c'è molta differenza fra i diversi tessuti e i differenti animali. Alcuni preparati dopo un mese non mostrano più traccia di verde o di blu; altri dopo sei mesi hanno ancora inalterato questo colore. L'HEIDENHAIN assicura di averne conservati benissimo per 2 anni.

È noto che il verde talora compare veramente verde, talvolta invece blu. La ragione, secondo alcuni, risiederebbe nell'impurità del colore, che spesso conserva tracce di metile violetto, e questo resiste di più. Ma tale ragione mi pare poco attendibile. Il LEVI ha sostenuto di recente<sup>1)</sup> che il colore azzurro risulta semplicemente da un effetto di contrasto dato dal fondo rosso; infatti, colorando con verde di metile le zolle di cromatina, queste, sul fondo incolore, apparivano perfettamente verdi; mentre che, frapponendo un diaframma rosso, apparivano azzurre. E sembrerebbe che questo esperimento fosse decisivo. Tuttavia ciò non è; e sta in fatto che, indipendentemente dal fondo, il verde di metile ora appare verde intenso, ora verdastro, ora azzurro-fosco-purpureo ed ora di un bell'azzurro. Io oserei affermare che queste differenze dipendono invece, se non completamente certo precipuamente, da una differenza chimica della sostanza nucleare. Per esempio gli spermatozoi (almeno nei molluschi) mi si sono colorati sempre in verde, e se ciò sembra dare ragione al LEVI, perchè qui nelle masse di spermatozoi vi è pochissimo citoplasma e quindi poco rosso, aggiungerò che nei granuli del così detto cervelletto dei cefalopodi ed anche nei granuli dei gasteropodi polmonati, dove pure il citoplasma è scarsissimo, ho sempre avuto una colorazione blu o azzurro-purpurea. E, d'altra parte, nelle cellule epiteliali e muscolari dell'intestino della rana, in mezzo al rosso del citoplasma, si scorgono i nuclei verdi, *non* azzurri; e verdi nello stesso animale sono i nuclei degli amibociti, mentre all'intorno, nel corpo citoplasmatico, brillano granuli d'un rosso vivo. Vero è che tali differenze potrebbero dipendere, piuttosto che da una proprietà della sostanza nucleare, da differenti modificazioni ch'essa ha subito per opera dei

---

<sup>1)</sup> LEVI GIUS., *Considerazioni sulla struttura del nucleo delle cellule nervose [dei vertebrati]*, Rivista di patol. nerv. e ment., Firenze 1898, pag. 289.

liquidi adoperati. Del resto la mia ipotesi s'accorderebbe colle esperienze *in vitro* del LILIENFELD<sup>1)</sup>. Ma devo anche ricordare che, qualche volta, con sezioni dello stesso materiale, ottenevo la colorazione nucleare verde quando non lasciavo le sezioni nell'acqua acidulata con acido acetico. Mentre, dopo questo bagno, ed aumentando la quantità di fucsina nella soluzione colorante, la tinta basica diventava blu e non più verde.

Certo è, ad ogni modo, che la colorazione è sempre d'esito dubbio, e ci vuole della costanza e tentativi svariati per riuscire nei singoli casi. Son sicuro che l'esatta obbedienza alle norme che ho dato più sopra faciliterà molto la riuscita. Ma sono anche sicuro, per esperienza mia, che quelle norme non sempre valgono. In conclusione, la colorazione è capricciosa; vale a dire che noi siamo all'oscuro sull'essenza di molti processi chimici che contribuiscono a farla fallire o a farla riuscire; e non è certamente una colorazione da consigliare ai principianti. Ma credo ch'essa sia di una importanza capitale, e che, per ora, non possa essere sostituita da altre più semplici o più durature.

Ho fatto ripetute prove, sostituendo l'emallume al verde di metile, per ottenere preparati duraturi, ed ho avuto qualche discreto risultato: ma quando si tratta di differenziare la diversa costituzione del nucleolo, quando si tratta di mettere in evidenza i rapporti fra le sostanze acidofile e basofile del nucleo, credo che bisogna ricorrere alla colorazione BIONDI-HEIDENHAIN, in soluzione molto allungata.

Dalle soluzioni concentrate ho avuto preparazioni di effetto, ma neanche lontanamente confrontabili alla delicatezza e precisione di quelle ottenute con le soluzioni allungate.

**93. Metodo Galeotti<sup>2)</sup>.** — Si fissano i pezzi d'organo (glandule, specialmente, ma anche giovani embrioni, muscoli, ecc.) nella miscela dell'HERMANN, oppure in un'altra analoga nella quale il cloruro di platino sia sostituito dal cloruro di palladio, e si lasciano per 24-48 ore [di solito meglio 2 giorni, piuttosto che uno solo]. Si lava in acqua corrente per 5-6 ore. Si cambia l'alcool diverse volte, si disidrata e si fanno le sezioni dalla paraffina; migliori risultati si hanno se le sezioni sono sottili (da 3 a 6  $\mu$ ); si attaccano al vetrino con l'acqua e si colorano per 5 minuti con fucsina acida in soluzione satura nell'acqua di anilina, riscaldando il liquido, nel quale si è posto il vetrino capovolto, a 60° C. Si lava in acqua corrente. Si trasporta in una soluzione di acido picrico nell'alcool (alcool a

<sup>1)</sup> In *Arch. Anat. Phys.; Phys. Abth.*, 1893, pag. 395.

<sup>2)</sup> In *Internat. Monatsschr. Anat. Phys.*, 12. 1895, pag. 26.

90 %, acido picrico a saturazione, poi un doppio volume di acqua (distillata) per pochi secondi e si torna a lavare in acqua corrente. Quindi si colora in una soluzione al  $\frac{1}{2}$  % di verde di metile nell'acqua e alcool a parti eguali, per 3-4 minuti. Si lava abbondantemente nell'acqua distillata, si passa subito nell'alcool assoluto finchè non si scioglie più verde di metile, si rischiara con xilolo e si chiude in balsamo.

Raccomando questa bella ed importante doppia colorazione, che dà risultati opposti a quelli della miscela BIONDI-HEIDENHAIN. Infatti col metodo del GALEOTTI tutti gli elementi del nucleo, ad eccezione della parte acidofila del nucleolo, si colorano in rosso; in rosso si colorano anche le granulazioni del citoplasma. Invece il fondo protoplasmatico della cellula compare di un giallo verdastro, e verde netto le granulazioni basofile, come per esempio la mucina.

Questa colorazione non è duratura; ma ha su tutte le altre doppie colorazioni il vantaggio di essere molto precisa ed elettiva, pur essendo rapidissima; bastano infatti 10 minuti per compiere tutte le operazioni.

**94. Miscela triacida dell'Ehrlich.** — Così ha chiamato l'autore una miscela fatta con le stesse sostanze coloranti del liquido BIONDI-HEIDENHAIN, ma nella quale è aumentata la dose della fucsina acida. Si prende: soluzione satura di Orange g. 120; Fucsina acida 80; Metile verde 100; Alcool assoluto 180<sup>1)</sup>; Acqua 300; Glicerina 50. Le soluzioni devono essere tutte sature; quando occorre prenderne dal recipiente, non si versi con esso, ma vi s'introduca invece una pipetta.

Questa miscela colora, a detta del LEE, più intensamente, ma meno delicatamente, di quella del BIONDI. Il verde di metile resiste di più.

**95. Emallume e Fucsina acida** — Un buon metodo per avere questa doppia colorazione è il seguente. Il pezzo, fissato in sublimato, è colorato *in toto* con l'emallume, poi tenuto per 24 ore nell'acqua alluminata 1%; ripetutamente lavato nell'acqua distillata, poi disidratato, ecc. Le sezioni, attaccate al vetrino, sono (dopo sciolta la paraffina e passate nell'acqua) colorate con una soluzione 0.5 % di fucsina acida. Dopo pochi minuti, 3-5, si lava bene con acqua distillata si disidrata, passando subito nell'alcool assoluto, che scioglie pochissimo la fucsina, si rischiara con xilolo e si chiude in balsamo-xilolo.

Volendo fare la doppia colorazione sulle sezioni si unisce a 10 vo-

<sup>1)</sup> Al solito, anche qui metter l'alcool assoluto è un buttar via dei denari. Si metta alcool a 90 % circa 200 cc. e acqua distillata 280; il risultato sarà lo stesso.

lumi di emallume 1 di fucsina acida 0.5 ‰, si allunga con 20 volumi d'acqua e si colora per 10-15 minuti. Si lava con acqua distillata (quella comune porta via troppa fucsina) e poi si passa subito nell'alcool assoluto, ecc. Gli alcoli intermedi portano via la fucsina molto più dell'alcool assoluto.

Finalmente questa doppia colorazione può farsi *in toto*. Il pezzo fissato in sublimato si mette nell'emallume parti 4; fucsina 0,5 ‰ parti una; si lascia per diverse ore secondo la grossezza (ad ogni modo si prendano sempre dei pezzi piccoli) da 12 a 24; si lava in acqua distillata, ecc. Le sezioni trattate col xilolo si chiudono in balsamo-xilolo; devono essere piuttosto sottili, meno di 7  $\mu$ , perchè la colorazione è intensa.

**96. Emallume (o carmallume) e Indacocarminio.** — Secondo la formula del MAYER <sup>1)</sup>. Soluzione di indacocarminio 1, alcool a 70 200; 1 g. di questa si mesce con 4-20 g. di emallume o carmallume. La soluzione è duratura; l'indaco non colora nè i nuclei, nè il muco, ma solo il plasma. Serve per pezzi fissati in sublimato.

**97. Emallume ed eosina.** — Anche qui si può procedere colorando *in toto* con l'emallume, e sulle sezioni con l'eosina (1 a 200 d'acqua, oppure 100 acqua e 100 alcool 90 ‰). Ma questa doppia colorazione è certamente inferiore a quella con la fucsina.

**98. Saffranina e verde luce.** — Si ha con questa doppia colorazione l'effetto inverso di quella BIONDI-HEIDENHAIN; cioè il nucleo rosso e il plasma verde. Con sezioni molto sottili, di materiale fissato in soluzioni osmiche, si colora per 24 ore con la saffranina; poi si scolora e si rimette nell'acqua: quindi si colora con verde luce 1, alcool 70 ‰ 500, per un minuto; si torna a lavare, si disidrata e si chiude in balsamo. Il color verde non è di lunga durata.

**99. Saffranina ed acqua blu (wasser blau).** — È una buona e semplice doppia colorazione, di facile uso e che regge bene nell'alcool. Con materiale fissato nelle soluzioni osmiche (liquido del FLEMMING e dell'HERMANN) si colorano le sezioni con l'acqua blu per 24 ore e poi nella saffranina per 5-6 ore. L'acqua blu si adopera in soluzione acquosa concentrata.

**100. Miscela C dell'Ehrlich** (miscela per cellule eosinofile, miscela acidofila). Indulina, Eosina e Auranzia 1 g. di ciascheduna, glicerina 30 g. La soluzione sciropposa si adopera col mettervi sopra il vetrino colle sezioni capovolte, e lasciarvelo 24 ore; si ha una buona colorazione da materiale fissato con liquido del FLEMMING.

**101. Triplice colorazione del Flemming.** — Le sezioni, fissate con la miscela del FLEMMING, si colorano a lungo, per 2-3 ed anche più

---

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1896, pag. 320.

giorni, con una soluzione di saffranina (alcoolica concentrata e allungata con altrettanta acqua di anilina). Si lava con acqua distillata e si differenzia con alcool a 90 % leggermente acidulato (meno di 0.1%) con HCl, finchè il colore è quasi tutto estratto; poi si torna a colorare per 1-3 ore con violetto di genziana (soluzione acquosa concentrata, od anche soluzione del GRAM, vedi capitolo V). Si lava rapidamente nell'acqua distillata, e poi si passa in una soluzione concentrata, od anche addirittura satura, di Orange G, per pochi minuti, finchè la maggior parte del color violetto se ne va. Quindi alcool assoluto, olio di garofano o di bergamotto e si chiude.

Il LEE (pag. 217 della quarta edizione) trova che il metodo adatto, secondo il FLEMMING, per le sezioni sciolte, cioè fatte da pezzi in celloidina, non serve per le sezioni attaccate al vetro; ed afferma che l'orange non scaccia l'eccesso di violetto di genziana. Trova che le indicazioni del FLEMMING vanno corrette così: colorazione col violetto di genziana mezz'ora, trattamento con l'orange un quarto d'ora. Inoltre la colorazione è capricciosa, e non si è mai sicuri del successo; ma, quando riesce, dà risultati splendidi.

Malgrado quelle obiezioni, credo importante far prove ripetute con questo metodo, al quale la grande autorità dell'autore dà certamente molto valore. Il FLEMMING (che del resto non è quel volubile inventore di metodi come tanti altri) l'ha usato anche di recente<sup>1)</sup>. Questa non è che una doppia colorazione, perchè l'orange ha il solo scopo di ridurre il violetto di genziana. La cromatina e i nuclei compaiono rossi, le fibrille dei fusi acromatici grigi-bruni od anche violacei; centrosomi, corpo intermedio e sfere attrattive rosastri, se la colorazione è chiara, bruno-violetti quando è più forte.

## CAPITOLO VII.

### Colorazione. Colori metallici. Impregnazione.

**102. Generalità.** — Certi sali metallici (d'argento, d'oro, d'osmio) hanno la proprietà di *ridursi* in presenza della sostanza organica, depositandosi così sotto forma di una polvere impalpabile negli elementi dei tessuti, e dimostrando una speciale elettività per alcuni di essi.

Questi sali non vengono *ridotti* per l'azione della luce, ma bensì della sostanza organica, e la presenza della luce aiuta in questo caso la riduzione. È dunque del tutto inutile tenere all'oscuro, o in bot-

<sup>1)</sup> In *Arch. Anat. Phys., Anat. Abth.*, 1897, pag. 171.

tiglie colorate, le soluzioni; quello che importa è che sia impedita completamente l'entrata della polvere (nella quale esiste sempre della sostanza organica) nei recipienti.

In questa azione dei sali metallici sui tessuti abbiamo talvolta delle vere colorazioni (cloruro d'oro, acido osmico) talvolta, più di sovente, delle semplici impregnazioni (nitrato d'argento), oppure anche solamente dei depositi pericellulari e perifibrillari (metodi GOLGI al cromato d'argento; capitolo XXIV).

**103. Nitrato d'argento.** — Molto in voga un tempo (RANVIER, ecc), ora caduto quasi completamente in disuso. Veniva adoperato in soluzione 1 %, 0,2 %, per colorare le membrane.

I tessuti, freschissimi, finchè sono immersi nella soluzione devono essere tenuti in movimento, per evitare il depositarsi sulla loro superficie di alcuni sali d'argento che si formano. Dopo un tempo variabilissimo, si lava a lungo con acqua distillata e si colora con una tinta del carminio. Alcuni lavano con una soluzione d'iposolfito sodico (2 %), poi con acqua distillata, poi colorano.

Per gli animali marini si fissa prima con acido osmico 1 a 200, si lava a lungo con acqua distillata, poi si tratta per pochi minuti (5-10) con nitrato d'argento 1 % (HERTWIG). Oppure si pongono, ancora viventi, per un'ora nella soluzione 5 % di nitrato potassico, si lavano bene e poi si trattano col sale d'argento (HARMER).

**104. Cloruro d'oro** <sup>1)</sup>. — Incertissimo nella sua azione, dà talvolta, e ha dato nelle mani di sperimentatori abili, dei risultati splendidi, specialmente per le terminazioni nervose. Mentre il rimanente tessuto è colorato d'un rosso porpora, le fibre nervose e le terminazioni prendono un intenso e splendido colore violetto, talvolta quasi un nero brillante. Ma non si dimentichi che questo, *come tutti gli altri metodi speciali, deve essere sempre controllato con esami fatti con i metodi generali*. Questo s'intende per i soliti metodi, dei quali è detto qui sotto, non per quelli dell'APÀTHY che saranno descritti nella parte speciale (vedi capitolo XXIV).

**105. Metodo Löwit-Ranvier.** — Pezzi di muscolo striato, per lo studio delle placche motrici, si tengono nella miscela acido formico parti 1, cloruro d'oro 1 % parti 4 per un tempo variabile. Il RANVIER suggerisce 20 minuti per i muscoli della lucertola. Invece per le terminazioni nervose nell'epidermide dell'uomo neonato occorre un'ora <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> « GRUBLER e C. mi hanno comunicato che il cloruro d'oro *fuscum* (questo è il sale d'oro fuso) contiene il 53 % e quello *flavum* (sale cristallizzato) soltanto 48 % di metallo. In ambedue, oltre all'oro, non esiste che acido cloridrico e acqua. Invece il cloruro doppio d'oro e sodio contiene non meno del 15 % di cloruro sodico, spesso di più » (Nota del MAYER in: LEE e MAYER, op. cit., pag. 215).

<sup>2)</sup> RANVIER, *Traité technique d'histologie*, pag. 826 e 900, Paris, 1889.

Poi si passa nell'acido formico parti 1, acqua distillata parti 4, e si lascia alla luce diffusa finchè la reazione è avvenuta. Si può lavare con acqua distillata prima di passare nella soluzione di acido formico.

Lo stesso RANVIER consigliava anche il succo freschissimo di limone (filtrato attraverso un pezzo di flanella), invece dell'acido formico. I pezzi di muscolo, appena tolto all'animale vivente, vi sono tenuti per 5-10 minuti, poi lavati con acqua distillata, poi lasciati per 20 minuti nel sale d'oro 1 ‰; rilavati e messi, per ridursi, in 50 cc. d'acqua distillata acidulata, con 2 gocce d'acido acetico comune. Si lasciano alla luce, e dopo 24-48 ore la riduzione è avvenuta. Questa serve per preparati da esaminare al momento, ma per quelli permanenti è preferibile fare la riduzione all'oscuro nella soluzione del LÖWIT (acido formico 1, acqua distillata 4). I preparati possono essere conservati nella glicerina (leggermente acidulata) o nel balsamo del Canada.

**106. Metodo Löwit Cipollone** <sup>1)</sup>. — Quest'ultimo, per lo studio delle terminazioni nervose nei muscoli striati, prende piccoli pezzi di circa 2 mm. di spessore e li pone nell'acido formico 2 ‰, nella stagione calda, e al 20 ‰ durante l'inverno. Nella soluzione sono tenuti da un quarto d'ora fino a mezz'ora, poi si lava con acqua distillata, si asciuga con carta bibula e si trasporta nel cloruro d'oro 1 ‰, dove si lasciano per un'ora o più. Quindi si lavano nell'acqua distillata e si avvolgono dentro pezzetti di membrana d'uovo fresco di pollo, formando una specie di sacchetto che si lega alle due estremità; quindi si rimettono nell'acido formico 2 ‰ per 24 ore, od anche di più, ed in questo caso è bene rinnovare il liquido. La riduzione è meglio che avvenga alla luce diffusa e lasciando sotto al recipiente un pezzo di carta bianca. Sarà bene, per una o due ore, esporre i sacchetti direttamente ai raggi solari. La reazione avviene più facilmente ad una temperatura di 20-25° C. Sciolti i sacchetti, si lavano i pezzi nell'acqua distillata e poi si passano nella glicerina e acido formico 2 ‰ parti eguali, per 1-2 ore; quindi si mettono nella glicerina pura e si fa la dissociazione. Per questo basta anche la compressione del vetrino, purchè si abbiano dei pezzetti non più spessi di 1 mm. I preparati si conservano nella glicerina.

**107. Metodi dell'Apáthy** <sup>2)</sup>. — Il risultato tecnico importante, ottenuto dall'autore, è quello di avere la reazione specifica nelle fibre nervose, oltre che a fresco, anche sulle sezioni di materiale fissato e imparaffinato secondo le solite norme; così che è possibile, con la serie

<sup>1)</sup> In *Annali di medicina navale*, 3. 1897.

<sup>2)</sup> *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12, 1896, pag. 718.



di sezioni, di seguire tutto il decorso delle fibre. Ma questo risultato non fu raggiunto completamente, finora, che in un solo gruppo d'animali, negli *Hirudinei* (sanguisughe d'acqua dolce e marine). Qualche prova è riuscita anche in alcuni vertebrati, ma in generale qui i metodi si sono mostrati incerti. Tuttavia l'autore è convinto che si tratta solo di stabilire, caso per caso, le modalità del metodo, ma ch'esso dev'essere applicabile sempre, in tutti gli animali. Più di recente il BETHE <sup>1)</sup>, in una nota preliminare, annunciava di aver trovato, anche per i vertebrati, un metodo corrispondente a quello dell'APÀTHY, ma, benchè promettesse di pubblicarlo fra breve, finora ne sappiamo niente di più. Per i metodi dell'APÀTHY, vedi nella parte speciale: preparazione del sistema nervoso centrale e periferico (capitolo XXIV).

**108. Acido osmico e cloruro d'oro.** — Questo metodo si deve al VIALLANAS, ed è raccomandato dal LEE. I tessuti sono trattati con la soluzione osmica 1 % finchè cominciano a diventare bruni; allora si passano nella soluzione 4 % di acido formico per 10 minuti, e quindi nel cloruro d'oro 1 a 5000 per 24 ore, allo scuro. Quindi si riducono, alla luce, in una soluzione d'acido formico al 25 %.

L'**acido osmico**, da solo, è stato usato come fissativo e colorante per molto tempo nelle celebri ricerche sul sistema nervoso e sulla retina, per opera di MAX SCHULTZE e di tanti altri, ma ho già avvertito (vedi capitolo II) che per lo studio citologico non è adatto, a cagione delle alterazioni che produce nella costituzione del nucleo, ed ormai da solo viene adoperato ben di rado.

**109. Acido osmico e pirogallico**, secondo LEE ed HERMANN. — Si fissa il tessuto nel liquido del FLEMMING o dell'HERMANN per 12 o 24 ore e quindi si passa in una soluzione debole di acido pirogallico; gli oggetti piccoli vi resteranno un'ora; quelli più grossi fino a 24. Qualche volta invece della soluzione acquosa si prende quella alcoolica <sup>2)</sup>.

Secondo l'autore inglese questo metodo è ottimo per lo studio del nucleo accessorio (*Nebenkern*); non occorre ulteriore colorazione, perchè la cromatina rimane più oscura del plasma. Con gl'invertebrati si ottengono delle elegantissime differenziazioni del tessuto nervoso. Il metodo è facilissimo, ma non si può chiamare un metodo di prim'ordine <sup>3)</sup>.

**110. Cloruro di Palladio**, secondo il Paladino. Vedi parte speciale, capitolo XXIV

<sup>1)</sup> *Morph. Arbeit.*, 8. 1898, pag. 95.

<sup>2)</sup> Quando l'una si debba preferire all'altra, e di che forza queste soluzioni debbano essere, il LEE non dice.

<sup>3)</sup> LEE, *Vademecum*, IV ediz. inglese, pag. 259.

## CAPITOLO VIII.

## Disidratazione e rischiaramento.

**111. Generalità.** — Fissati e induriti, i pezzi saranno prima completamente disidratati e poi rischiarati; e rischiarati sia per essere facilmente esaminati *in toto*, sia per venire rivestiti con la paraffina e quindi tagliati in fette sottili. Ma se il rivestimento si fa con la celloidina, allora bisogna arrestarsi al disidratamento.

Questo consiste, come dice la parola, nel levare completamente l'acqua contenuta nei tessuti, la qual cosa è necessaria per poter fare le operazioni successive. Il rischiaramento ha lo scopo di imbevare il pezzo con una sostanza oleosa, di un indice di rifrazione elevato, in modo da renderlo omogeneo e trasparente. Così si possono fare delle importantissime osservazioni di fina anatomia, esaminando, per esempio, un piccolo animale, od un organo, messo sotto al microscopio, nello stesso liquido oleoso che ha servito per rischiararlo. Se si vuole senz'altro chiuderlo e conservarlo, basterà togliere l'eccesso di rischiarante con della carta da filtro, passare il pezzo nel xilolo, nel cloroformio o nel benzolo, e chiuderlo col balsamo, sciolto in una di queste tre ultime sostanze.

Il rischiaramento è necessario anche quando si voglia rivestire il pezzo con la paraffina, per poi sezionarlo. Infatti il liquido rischiarante si sostituisce a poco a poco all'alcool assoluto, e così il pezzo rimane penetrato ed imbevuto tutto di una sostanza nella quale la paraffina si scioglie.

**112. Disidratazione.** — Questa si compie con l'alcool assoluto, ma in generale non è bene passarvi direttamente il pezzo tolto dall'acqua.

Si comincerà prima dal tenerlo nell'alcool debole, a 50 % per mezz'ora e fino a 2 ore, a seconda della consistenza e del volume; poi in quello a 70-80 %, per un'altra mezz'ora ed anche un'ora; ancora di più nell'alcool a 90 e 95 %. Si passerà quindi nell'alcool assoluto, e questo verrà cambiato almeno una volta, e sarà messo in quantità non scarsa (5-10 volte il volume del pezzo). Si terrà sempre ben chiuso il recipiente contenente l'oggetto con l'alcool assoluto, e vi si lascerà per un quarto d'ora, se è molto piccolo e se si tratta di un tessuto omogeneo, altrimenti bisognerà tenervelo per una o due ore.

Se la disidratazione è compiuta bene, il pezzo, levato dall'alcool e passato nel liquido rischiarante, non intorbida quest'ultimo; se ciò accade vuol dire: o che il disidratamento non fu compiuto, o (ed è

quel che succede assai più facilmente) che l'alcool non era assoluto, ma conteneva piccole quantità d'acqua. In tal caso bisogna rimettere il pezzo nell'alcool, assicurandosi che questo sia anidro (vedi nell'elenco dei reagenti, capitolo XX).

Se i pezzi sono stati fissati o con l'acido picrico, o col sublimato acetico alcoolico, e quindi già direttamente passati nell'alcool a 80 %, è ovvio intendere che per la disidratazione si passerà senz'altro agli alcoli di forza superiore, 90 e 95 %, per quindi giungere all'alcool assoluto.

Un'avvertenza importante, e spesso trascurata, è quella di limitare la disidratazione al tempo puramente necessario; essa va fatta rapidamente, cambiando l'alcool assoluto una o magari due volte; se si tratta di un oggetto piccolo, basterà un quarto d'ora od anche meno. In alcuni casi sono sufficienti pochi minuti. La disidratazione prolungata indurisce il pezzo e rende più difficile il successivo rischiaramento; il soverchio indurimento fa sì che le sezioni si tagliano male, perchè il tessuto o è troppo resistente, o diventa molto friabile.

Nel fare la disidratazione di qualche piccolo pezzo, come pure di sezioni tenute sul vetrino (vedi capitolo XI), si rammenti che basta il vapore acqueo dell'aria, e quello del fiato per idratarlo, cagionando l'intorbidamento con le sostanze rischiaranti, le quali esigono una perfetta disidratazione. Bisognerà aver presente questo pericolo ed eseguire l'operazione con rapidità, tenendo il meno possibile l'oggetto esposto all'aria o troppo vicino alla faccia. Speciale importanza avrà poi la condizione del laboratorio, che dovrà esser bene asciutto e facilmente riscaldabile.

**113. Rischiaramento.** — Le sostanze rischiaranti sono numerose, e nella loro scelta bisogna tener conto anche del prezzo, che per talune è elevato. Il maggior numero di esse è dato da oli essenziali (essenza di trementina, olio di garofano, di legno di cedro, di bergamotto, di origano, di anilina), o da carburi d'idrogeno (xilolo, benzolo, toluolo), o da sostanze diverse, come il creosoto ed il clorofornio.

Dell'olio (o essenza) di trementina oggidì si fa poco uso; anche il creosoto è adoprato di rado, e solo quando si tratta di rischiarare oggetti che non si possono, o non si vogliono, mettere nell'alcool assoluto. Infatti il creosoto si mescola facilmente, e senza intorbidarsi, con l'alcool a 90 %.

Il clorofornio esige una disidratazione perfetta; ha un indice di rifrazione basso (vedi § 114) ed è molto volatile, perciò non si usa per rischiarare un pezzo che dev'essere studiato *in toto*. È invece largamente adoperato come *medium* dall'alcool assoluto alla paraffina, perchè è più pesante dell'alcool, scioglie una discreta quantità di

paraffina e non altera per niente i tessuti, anche lasciandoveli dentro a lungo. Ma è necessario che tutto il cloroformio, del quale il pezzo è imbevuto, evapori, prima di fare l'imparaffinamento, perchè, se ne rimane qualche poco, le sezioni si taglierebbero male. Della presenza del cloroformio nell'interno del pezzo ci si accorge, quando si fanno le fette, dall'aspetto biancastro e come disseccato della parte centrale della superficie di sezione.

L'olio di legno di cedro è uno dei migliori liquidi rischiaranti. Esige, anch'esso, una disidratazione completa; ha un indice di rifrazione molto elevato, è pochissimo volatile, denso. Serve quindi ottimamente per rischiarare *in toto* piccoli animali, embrioni, ecc., che devono poi essere studiati e disegnati con un debole ingrandimento. Ma bisogna ricordarsi che talvolta presenta un gravissimo inconveniente: raggrinza, deformandoli, certi tessuti e certi elementi; si dovrà dunque servirsene con prudenza. Come *medium*, per l'imparaffinamento, l'olio di legno di cedro ha pure grandi vantaggi, benchè sciolga poca paraffina (in media 5 %), perchè è più pesante dell'alcool assoluto, non è di danno ai tessuti, anche se questi vi restano immersi a lungo. Vero è che evapora più difficilmente del cloroformio e dei carburi d'idrogeno; ma, per compenso, non reca disturbo se rimane nel tessuto, purchè in piccola quantità, anche dopo fatto l'imparaffinamento. Tuttavia presenta qualche volta, come si è già detto, l'inconveniente di raggrinzare e deformare i tessuti.

Dei tre carburi d'idrogeno, xilolo, benzolo e toluolo, il terzo non si adopra perchè troppo volatile. Lo sono abbastanza anche gli altri due, e il benzolo più del xilolo, perciò non si usano per rischiarare *in toto*, ma soltanto come *medium* per l'imparaffinamento. Sciogliono facilmente la paraffina ed evaporano presto, ma raggrinzano non di rado i tessuti, ed essendo più leggeri dell'alcool assoluto non si possono sostituire a questo così gradatamente, come si fa per il cloroformio e per l'olio di legno di cedro.

L'olio di anilina e di garofano hanno un indice di rifrazione elevatissimo, ed esigono una buona disidratazione; mentre l'olio di origano e l'olio di bergamotto si mescolano con l'alcool a 95-96 %. Questi quattro oli non sono adoperati nè per i pezzi *in toto*, nè per l'imparaffinamento, ma soltanto per rischiarare le sezioni che devono essere chiuse nel balsamo. E a seconda che le sezioni furono fatte da pezzi rivestiti con la celloidina o con la paraffina, e a seconda delle sostanze coloranti adoperate per tingere le sezioni, si dovrà preferire l'una o l'altra sostanza rischiarante. E le opportune indicazioni verranno date a suo tempo. Qui basterà aggiungere che delle sostanze sopra ricordate non si usa più la trementina, eccetto casi rari; non si usa neppure il creosoto, nè il cloroformio, nè l'olio

di legno di cedro. Quindi quelle più adoperate sono : benzolo, xilolo, toluolo, olio di garofani, olio di bergamotto, olio di origano.

Ecco intanto una tavola che contiene l'indice di rifrazione di queste e di altre poche sostanze, delle quali avrò occasione di parlare. Quanto più alto è l'indice di rifrazione tanto maggiore è il potere rischiarante della sostanza.

**114. Indice di rifrazione di alcune sostanze :**

Aria	1.000	Benzolo e xilolo	1.497
Acqua distillata	1.336	Olio di legno di cedro	1.510
» di mare	1.343	Gomma arabica	1.514
Alcool assoluto	1.367	Olio legno cedro ispessito	1.520
Glicerina e acqua, ana	1.397	» di garofano	1.533
Cloroformio	1.449	Balsamo del Canada	1.535
Olio di bergamotto	1.464	Creosoto	1.538
» » trementina	1.473	Olio di anilina	1.580
Glicerina conc.	1.473	Monobromuro di naftalina	1.660

È importante tener conto dei dati di questa tabella; infatti essi ci spiegano perchè, ad esempio, i preparati chiusi in glicerina siano meno trasparenti di quelli chiusi in balsamo, e come questo diminuisca o aumenti il suo potere di rifrazione a seconda delle sostanze nelle quali è sciolto.

Alcune sostanze rischiaranti non si alterano, anche se tenute a lungo nei recipienti soliti; per quelle volatili, benzolo, xilolo, basterà aver tappi buoni, che chiudano ermeticamente. Altre, come gli oli di bergamotto, di anilina, di legno di cedro, di garofano, si alterano, lentamente ma profondamente, per l'azione dell'ossigeno; diventando più scuri, o più densi, e perdendo molto della proprietà di rischiarare. Occorre tenerne piccolissime quantità alla mano, e chiudere con paraffina o con ceralacca i recipienti maggiori nei quali si conservano; ogni tanto se ne prende la piccola quantità occorrente e poi subito si torna a sigillare con cura. Oppure, si suddivide l'olio in tanti recipienti di piccole dimensioni, che saranno tenuti ben chiusi e sigillati. Avverto che questi oli rischiaranti sono molto spesso sofisticati; bisogna quindi farne acquisto da commercianti fidati.

## CAPITOLO IX.

## Rivestimento dei pezzi.

**115. Generalità.** — Una delle più grandi difficoltà che s'incontra nello studio dell'istologia era quella di fare tagli sottili di oggetti molto piccoli e delicati, formati da tessuti di consistenza assai diversa e con delle cavità. Solo quando si potè rivestire e penetrare il pezzo con una sostanza indifferente, solida, ma non dura e facilmente solubile, la difficoltà fu completamente superata. Infatti con questo mezzo si ottiene che il coltello tagli una massa consistente ed uniforme, nella quale il pezzo da studiare è immerso e immedesimato completamente. Le sostanze in uso da tempo, ed ormai riconosciute universalmente come le migliori, sono due soltanto: la *paraffina* e la *celloidina*. Questa non è altro che un collodio, cioè del cotone fulminante sciolto nell'etere solforico, purificato e poi disseccato. Viene venduta in tavolette, ed ha molta notorietà quella della ditta SCHERING di Berlino. La paraffina è un petrolio solido, che si fonde al calore; vi sono paraffine tenere che fondono anche a meno di 40° C., altre, più dure, fondono a 50°, 55° e 60° C.

Nella tecnica istologica occorrono tutte e due queste sostanze, per quanto la paraffina sia di uso più largo e generale. Ma è un grave errore, nel quale cadono parecchi, credere che la paraffina possa sostituire sempre la celloidina; com'è una inutile perdita di tempo adoperare quest'ultima, quando la prima risponde meglio allo scopo.

Così, quando la temperatura estiva è molto elevata, non è possibile fare sezioni di pezzi rivestiti con la paraffina, perchè questa, oltre i 25° C, si rammollisce, anche se è della più dura, e s'attacca al coltello. Vero è che si può produrre un abbassamento di temperatura servendosi di uno specchio parabolico, nel fuoco del quale si mette del ghiaccio, come ha insegnato il FOL; ma il rimedio non è sempre comodo, perchè non sempre si può avere sottomano quel che occorre. Necessaria poi è la celloidina quando si tratta di oggetti delicati che si guasterebbero per l'azione del calore.

Su questo punto occorre insistere, per avvertire che specialmente il tessuto muscolare degli animali in genere e il vitello delle uova sotto l'azione del calore s'induriscono e diventano friabili. In tali casi è impossibile avere sezioni buone e sottili da materiale imparaffinato.

La celloidina può essere lasciata sulle sezioni anche dopo chiuso il preparato, perchè è perfettamente trasparente; e questo costituisce un altro vantaggio sulla paraffina. Infatti, quando si tratta di

sezioni di materiale poco compatto, o che presenta delle appendici, per esempio, delle porzioni di zampe, di antenne, ecc., può darsi che queste parti non si mantengano bene in sito quando sia tolta la paraffina, e quindi giova servirsi della celloidina.

A differenza della paraffina, essa è poi permeabilissima, ed anche questo può essere in parecchi casi di grande utilità. Infatti, pezzi delicati che debbono subire dei trattamenti energici vengono prima bene rivestiti di celloidina, e quando questa è indurita possono essere passati impunemente in qualunque sostanza, senza che abbiano da soffrire delle contrazioni, dei ripiegamenti, ecc. Così per esempio quando un pezzo dev'essere decalcificato; così quando si deve fare una macerazione, od una digestione parziale. In quest'ultimo caso l'operazione può essere fatta egualmente sulle sezioni, anche se ottenute con la paraffina, rivestendole d'uno straterello di celloidina, nel modo che sarà più avanti indicato (capitolo XIII).

Più comunemente serve la paraffina, perchè essa ha sulla celloidina due grandi vantaggi: permette di fare le sezioni sottili (da  $5 \mu$  fino a  $2 \mu$ ); e queste possono essere tagliate una attaccata all'altra, cioè a nastro, con grande risparmio di tempo, e facilitando le successive operazioni. Inoltre, il tempo che occorre per fare un rivestimento nella paraffina è molto più breve di quello necessario per il rivestimento con la celloidina.

Per le sezioni sottilissime, di  $1 \mu$ , ed anche meno, bisogna ricorrere al rivestimento misto (§ 119).

**116. Rivestimento con la celloidina.** — Dei pezzi di celloidina vengono pesati e messi dentro bottiglie col tappo smerigliato, che chiuda bene, poi si versa alcool assoluto ed etere solforico a parti eguali. Si fanno così delle soluzioni più o meno dense; delle quali due almeno sono necessarie: una al 4% e l'altra all'8%; meglio prepararne anche una terza più allungata, al 2%. Quando i recipienti non devono essere usati per qualche tempo, e specialmente nei mesi estivi, sarà bene rendere la chiusura ermetica, fondendo della paraffina intorno al tappo della bottiglia, oppure sovrapponendovi un pezzo di vescica bagnata che si lega strettamente al disotto dell'orlo del collo della bottiglia. Così verrà impedita l'evaporazione delle due volatilissime sostanze, alcool assoluto ed etere solforico.

I pezzi da rivestire con la celloidina, dopo essere stati bene disidratati con l'alcool assoluto, verranno passati per un quarto d'ora, o per più ore (se si tratta di pezzi voluminosi), nell'alcool assoluto ed etere solforico a parti eguali, dentro un recipiente ben chiuso.

Da questo si trasportano nella soluzione di celloidina più allungata e vi si lasciano per un tempo variabile, a seconda della consistenza e del volume. Se si tratta di un pezzo voluminoso e con delle cavità interne sono necessari parecchi giorni, una settimana ed

anche due. Se si tratta di un pezzo omogeneo, piccolo e senza cavità, basteranno uno o due giorni. Dalla soluzione più allungata si fa il passaggio in una più densa, e poi in quella 8 ‰. Anche in quest'ultima il pezzo dev'essere lasciato a lungo, regolandosi come s'è detto per la prima soluzione.

Quando si è sicuri che la penetrazione della celloidina è completa, si fa il rivestimento, cioè si pone in una scatoletta di carta (che si fa al momento, regolandosi sulla dimensione del pezzo) della celloidina densa, 8 ‰, e vi si mette l'oggetto, orientandolo nel modo desiderato. In generale trovo più comodo, e preferisco, di avvolgere intorno ad un cilindretto di legno dolce (*non* di sughero), di dimensioni corrispondenti al foro del portaoggetti del microtomo THOMAS-JUNG (o di una dimensione qualunque, se si tratta di un microtomo col portaoggetti a morsa), un pezzo rettangolare di carta fina, ma abbastanza robusta, facendola sporgere, al di sopra di una delle superficie piane del cilindro, per un'altezza di qualche millimetro maggiore di quella dell'oggetto. Così ottengo una cavità cilindrica nella quale verso prima la celloidina densa, e pongo dopo l'oggetto orientandolo con cura.

Ma se quest'ultimo è piccolissimo si può senz'altro deporre una goccia di celloidina densa sulla superficie libera del cilindro di legno dolce, e su quella mettere il pezzo, che con un'altra goccia rimarrà completamente rivestito.

L'indurimento della celloidina si fa molto lentamente all'aria, e può darsi, non di rado, che appena fatto il rivestimento si scorgano numerose bolle d'aria rimaste nella celloidina. Per levarle bisogna mettere il pezzo in un recipiente che chiuda bene e sul cui fondo si sia versato un poco d'etere solforico; questo non dev'essere a contatto col pezzo. Si tappa con cura e si lascia stare per un paio d'ore; i vapori d'etere faranno scomparire le bolle.

Dopo qualche tempo la superficie della celloidina si sarà rappresa, ma l'interno avrà ancora una consistenza semifluida; allora si può affrettare l'indurimento tenendo il pezzo nello stesso recipiente che ha servito per l'etere, e sul fondo del quale sia posto del cloroformio. Chiuso ermeticamente il recipiente, i vapori di cloroformio danno in poche ore una discreta consistenza a tutta la massa. Allora essa viene immersa nell'alcool forte, 80 ‰, che completa l'indurimento in due o tre giorni.

Il metodo più adatto per indurir bene la celloidina è il seguente: la scatoletta di carta, o il cilindro di legno, vengono messi dentro un recipiente. Può servire una vaschetta di vetro coperta da un disco smerigliato, se si tratta della scatola di carta; ed un vasetto di vetro con tappo, per il cilindro di legno. Il recipiente deve essere piccolo, in modo che non vi rimanga gran quantità d'aria, e



chiudere bene. A poco a poco le bolle d'aria ch'erano rimaste nella celloidina se ne vanno alla superficie e si dissolvono. Quando sono tutte sparite, si scopre il recipiente e si porta, così scoperto, dentro un vaso più largo, sul fondo del quale c'è dell'alcool a 80 %. Si copre questo secondo recipiente, e si lasciano agire i vapori dell'alcool, che induriranno la massa di celloidina; e dopo qualche ora, se si tratta di un blocco piccolo, oppure il giorno successivo, se il blocco è grande, si potrà mettere la scatola o il cilindro dentro l'alcool. Qui si completerà l'indurimento.

Quando si vogliono fare le sezioni, si leva la carta che involge il cilindro; o, se il pezzo è stato messo dentro di una scatoletta, dopo levata la carta, si lascia asciugare la superficie inferiore del parallelepipedo, la si bagna leggermente con dell'etere solforico, e con del collodio, o con della celloidina poco densa, 2-4 %, si attacca al pezzo di legno che poi sarà messo nel portaoggetti del microtomo. Appena il blocco è attaccato, si rimette tutto, cioè l'oggetto col sostegno di legno, nell'alcool a 80 % per completare l'indurimento dello straterello di celloidina interposta fra l'oggetto e il sostegno di legno.

Quindi si colloca a posto il pezzo nel microtomo, si bagna il coltello e la superficie dell'oggetto con l'alcool a 80 %, e si fanno le fette dello spessore voluto, avvertendo, come ho già detto, che difficilmente si potrà scendere al disotto dei 10  $\mu$ . Bisogna non lasciar mai asciugare la superficie del pezzo, nè la lama del coltello, ma tenere questa e quella inumidite costantemente con l'alcool. Un tempo si preferiva alcool più debole 60-70 %; ma oggi si ritiene più vantaggioso quello a 80 %.

Un altro metodo è il seguente: il pezzo indurito nell'alcool viene asciugato diligentemente e portato nell'alcool assoluto con olio di cedro, quindi nell'olio di cedro puro. Quando è bene rischiarato, se il pezzo non è attaccato al cilindro di legno, bisogna levare accuratamente tutto l'olio dalla superficie che dovrà venire attaccata al portaoggetti; quindi su questa superficie si passa un po' d'etere, e poi con la celloidina liquida si stende un leggero strato, per far aderire bene il pezzo alla base del portaoggetti. Dopo, si espone per qualche minuto ai vapori di cloroformio, per indurire tutta la celloidina che serve da cemento. Si torna ad inumidire la superficie superiore del pezzo da tagliare e quella del coltello con l'olio di legno di cedro e si fanno le sezioni, continuando sempre ad ungere con l'olio la superficie del blocco.

Per abbreviare il lungo periodo della penetrazione della celloidina il GILSON aveva pensato di riscaldare il tubo contenente il pezzo e la celloidina più liquida (4 %) dentro una stufa da paraffina a 50-60° C. Effettivamente in questo modo la penetrazione della celloidina si fa più facilmente, ma il metodo non è da consigliare, perchè non si

ottiene un buon rivestimento, e si va incontro all'inconveniente di dover tenere il pezzo ad una temperatura elevata.

Il LEE ha portato a questo metodo un'altra modificazione, che consiste nel tagliare il blocco *asciutto* e col coltello pure *asciutto*. Fatta la penetrazione della celloidina, si passa il pezzo in un recipiente sul fondo del quale si è messo il cloroformio, per ottenere l'indurimento coi vapori; ogni tanto si cambia di posizione il pezzo, perchè i diversi lati siano successivamente esposti all'azione dei vapori (inutile dire che il pezzo dev'essere collocato in modo da non trovarsi a contatto col cloroformio liquido) e poi si mette in una miscela di cloroformio ed olio di legno di cedro, quindi si trasporta nell'olio di legno di cedro solo. Quando è bene rischiarato, lo si lascia per qualche tempo esposto all'aria, così il cloroformio evapora completamente. Se l'oggetto non deve essere tagliato subito lo si conserva dentro un recipiente asciutto e ben tappato. Se deve essere tagliato lo si attacca nel solito modo e si taglia col coltello asciutto. Se l'indurimento e il rischiaramento sono stati ben fatti, si avranno delle sezioni di una sottigliezza ancora maggiore di quella che si può avere tagliando sotto l'alcool. Ma non credo che con questo metodo del LEE si possano avere sezioni molto sottili.

Molto meglio è seguire le indicazioni dell'APÀTHY. Il blocco, bene indurito e attaccato al portaoggetti, è immerso nella glicerina pura, finchè sia completamente imbevuto; occorrono 48 ore per un volume di un centimetro cubo. Quindi si asciugua con carta bibula e si mette per 24 ore in un essiccatore (una campana di vetro che appoggia, con l'orlo smerigliato, su di una lastra pure smerigliata; sotto si pone l'oggetto da essiccare ed un recipiente con cloruro, *non* ipoclorito, di calce).

Il blocco asciutto è messo nel microtomo e si taglia col coltello asciutto tenuto trasversale (§ 123), e mosso a colpi rapidi e leggeri. In questo modo si possono fare sezioni di 5 ed anche di 3  $\mu$ .

**117. Rivestimento con la paraffina.** — L'oggetto, bene disidratato con l'alcool assoluto, viene rischiarato con l'olio di legno di cedro, col cloroformio, col xilolo o col benzolo.

Se si tratta di oggetti delicati, si preferiscano i due primi, salvo i rari casi in cui l'olio di cedro raggrinza i tessuti. La ragione della preferenza sta in ciò: che il cloroformio e l'olio di legno di cedro possono sostituire gradatamente l'alcool assoluto, essendo più pesanti di questo. Ecco come si procede: In un tubetto, con l'alcool assoluto ed il pezzo da rischiarare, si versa il cloroformio, o l'olio di legno di cedro, servendosi di una pipetta, in modo che il liquido rischiarante tocchi il fondo. Si vedrà tosto l'alcool spostarsi in alto, e il pezzo rimanere tutto immerso in questo, proprio al limite fra i due liquidi. Dopo qualche tempo il pezzo sarà sceso in basso, ma

sarebbe errore credere che così il rischiarante lo ha tutto penetrato, poichè, essendosi formate delle correnti di diffusione, le due sostanze si saranno mescolate. Allora bisogna versar via tutto il liquido, e rimpiazzarlo con del rischiarante puro; dapprima il pezzo galleggerà, ma dopo qualche tempo scenderà al fondo. Con una pipetta si tolga un piccolo strato del liquido superficiale, nel quale facilmente può esser rimasta traccia di alcool assoluto.

Quando invece si voglia adoperare una sostanza che sciolga molta paraffina e sia facilmente volatile, si preferirà il xilolo od il benzolo, facendo prima un miscuglio dell'uno o dell'altro a parti eguali con l'alcool assoluto, e ponendovi l'oggetto disidratato. Dopo qualche tempo si passerà nel xilolo, o nel benzolo, puro. A seconda dello spessore del pezzo, occorre da un  $\frac{1}{4}$  d'ora a parecchie ore, perchè la sostituzione sia completa.

Ciò fatto, nel tubo contenente l'oggetto col rischiarante si mettono dei pezzettini di paraffina e vi si lasciano sciogliere a freddo per alcune ore; poi si porta sulla stufa, si aggiungono degli altri pezzetti di paraffina e si riscalda la stufa con la fiammella, in modo che l'oggetto si riscaldi lentamente, passando in un paio d'ore gradatamente dalla temperatura ambiente a quella di fusione della paraffina.

È di molta importanza procedere in questo modo, perchè così si può arrivare alla temperatura di 60° C. (che è la temperatura di fusione della paraffina più dura) senza danneggiare per niente il pezzo, anche se è molto delicato. È un grave errore passare d'un tratto l'oggetto da un liquido freddo alla paraffina fusa, fosse pure della più tenera; ed è di nessun vantaggio metterlo successivamente nella paraffina più tenera e dopo in una più dura. È preferibile porre subito nel rischiarante a freddo pezzi di paraffina eguale a quella che servirà per il rivestimento e fare così una soluzione satura a freddo; poi passare nella stufa fredda, riscaldarla, aggiungendo altri pezzi della stessa paraffina fino a fare una soluzione satura a caldo. Una mezz'ora dopo che la stufa ha raggiunto la temperatura di fusione della paraffina si trasporterà il pezzo dal tubo in un recipiente aperto (una vaschetta, una piccola capsula, ecc.), nel quale sia della paraffina già fusa. Così il rischiarante comincerà ad evaporare e la paraffina penetrerà completamente. Se l'oggetto è piccolo, se non contiene cavità rilevanti, dopo una mezz'ora il rischiarante sarà completamente evaporato (di ciò si potrà assicurarsi col naso) e la penetrazione compiuta. Se il pezzo è piuttosto voluminoso e con delle cavità interne, occorreranno due o tre ore e sarà meglio cambiare nel frattempo un'altra volta la paraffina. Quando le operazioni sopra indicate non potessero compiersi nella giornata si potrà alla sera spegnere la stufa, e riaccenderla al mattino seguente.

In casi eccezionali, di oggetti difficilmente penetrabili, sarà molto opportuno fare l'imparaffinamento nel vuoto, o per dir meglio, a bassa pressione; in questo modo resta agevolata grandemente la penetrazione della paraffina nel pezzo. Chi ha nel laboratorio acqua di condotta in pressione potrà facilmente fare il vuoto nel recipiente nel quale si trova l'oggetto e la paraffina.

Quando la disidratazione e il rischiaramento sono fatti con molta cura, la penetrazione della paraffina, seguendo le indicazioni date sopra, si ha in tempo abbastanza breve, risparmiando così il prolungato riscaldamento dell'oggetto. Ciò che è certamente dannoso, perchè produce un sensibile indurimento, specialmente in alcuni tessuti. Indurimento che si ha in grado notevole, e accompagnato da un raggrinzamento, quando si porta l'oggetto da un liquido freddo alla paraffina fusa. Invece col riscaldamento graduale e riducendo il tempo d'immersione nella paraffina calda si ha una minore alterazione del pezzo. E il tempo d'immersione sarà abbreviato quanto più è volatile il mezzo rischiarante, e quando con l'infusione a freddo si è già agevolata la penetrazione e la sostituzione della paraffina al rischiarante.

Quale paraffina si deve scegliere? In generale, quanto più la paraffina è dura e tanto meglio si fanno le sezioni, specialmente quelle continue con i microtomi rapidi. Tuttavia trattandosi di oggetti molto grandi (lo STRASSER ha fatto sezioni di 30  $\mu$  dell'intero cervello umano con un blocco di centimetri  $10 \times 15$ ) è preferibile prendere una paraffina meno dura, per quanto lo permette la temperatura del locale. Ma può darsi che la delicatezza dell'oggetto sia tale da non poterlo mantenere alla temperatura di  $60^{\circ}$  C., ed in questo caso si adopererà paraffina più tenera, cioè di punto di fusione più basso, fra i  $40$  e i  $50^{\circ}$  C. La scelta della paraffina dipenderà anche dalla temperatura del locale nel quale si dovrà poi tagliare; quindi quanto più fa caldo tanto più la paraffina dovrà essere dura, ma non si dimentichi che nella stagione fredda è assolutamente necessario riscaldare il laboratorio, altrimenti non si potrà tagliare neanche la paraffina più tenera. Con la temperatura di  $15^{\circ}$  C. si possono fare sezioni con paraffine fra i  $45^{\circ}$  e  $50^{\circ}$  C. <sup>1)</sup> Alla tempe-

---

<sup>1)</sup> Quando la paraffina è fornita da una ditta fidata, è inutile controllare la temperatura di fusione segnata dal venditore; ed occorrendo punti di fusione intermedi fra quelli delle paraffine che si possiedono, basterà farne dei miscugli in proporzioni diverse, per ottenere la temperatura desiderata.

Va ricordato qui, che quando si fonde e poi si raffredda ripetutamente la stessa paraffina, come pure quando si mantiene a lungo la paraffina fusa, si ha per risultato d'innalzare il punto di fusione. Sarà quindi prudente, specialmente se si tratta di materiale delicato, di non servirsi di paraffina già adoperata.

ratura di 16°-18° C. corrisponde bene quella a 55°-58° C., ed a 20°-22° C. la più dura, a 60° C. Ma questa può essere tagliata anche ad una temperatura di 25° C., benchè con una certa difficoltà, perchè comincia a rammollirsi. Ciò è quanto dire, che per noi in Italia, nel colmo della stagione estiva, non riesce facile fare sezioni durante il giorno, e che bisogna approfittare delle prime ore del mattino.

È stato proposto di aggiungere alla paraffina delle piccolissime quantità di cera vergine, per renderla omogenea e quindi più facile a tagliare; ma credo del tutto inutile l'aggiunta. Quel ch'è necessario è di tener conto di questi punti principali, nei quali si riassume la pratica del rivestimento con la paraffina:

1.° disidratare bene il pezzo nell'alcool assoluto, ma nel minor tempo possibile, per non renderlo troppo duro;

2.° rischiarare bene, ricorrendo al cloroformio o all'olio di legno di cedro quando si tratta di pezzi delicati; non è necessario allontanare proprio completamente il secondo, quando s'imparaffina. Per gli usi soliti serve il xilolo o il benzolo, ed è meglio adoprare queste sostanze prima mescolate con l'alcool assoluto e dopo da sole;

3.° fare una soluzione satura a freddo di paraffina (della temperatura di fusione corrispondente alla durezza voluta per tagliare) nel rischiarante contenente il pezzo, per parecchie ore (4-10), e portare poi tutto nella stufa fredda, che verrà riscaldata lentamente fino a raggiungere la temperatura di fusione della paraffina; altri piccoli pezzi di questa verranno aggiunti, fino ad avere una soluzione satura a caldo; quindi il pezzo sarà passato in un recipiente molto aperto e basso, contenente dell'altra paraffina fusa, in modo da facilitare l'evaporazione del rischiarante;

4.° trasportare il pezzo nella paraffina pura fusa, una e magari due volte, in un tempo variabile, a seconda della dimensione e della difficoltà di penetrazione, da mezz'ora (o anche meno) fino a due ore;

5.° ricorrere al vuoto per ottenere rapidamente la penetrazione dei pezzi difficili, poco permeabili;

6.° tutte le operazioni sopra indicate, quando vengono prolungate al di là del tempo strettamente necessario, e quando sono fatte trascurando le precauzioni opportune, hanno per risultato di indurire, rendere friabile ed anche diminuire il volume del pezzo, producendo talvolta delle gravi alterazioni nella struttura cellulare;

7.° d'altra parte, se le operazioni suddette non sono compiute fino a raggiungere lo scopo, cioè se la disidratazione non è completa, se il liquido rischiarante non si è completamente sostituito all'alcool, se la paraffina non ha scacciato tutto il rischiarante, non ha aderito bene alla superficie e penetrato tutti i più piccoli spazi del pezzo, si avrà per risultato un cattivo rivestimento, e quindi non si potranno avere delle buone sezioni; sarà poi impossibile ottenerne di sottili;

8.<sup>o</sup> ne deriva come immediata conseguenza la necessità di attenersi scrupolosamente a questi due consigli, spesso dimenticati dai principianti :

a) *non fare l'imparaffinamento di molti pezzi alla volta;*

b) *non abbandonare l'imparaffinamento a sè stesso, ma sorvegliarlo di continuo, rinunciando magari a qualunque altro lavoro.*

**118. Preparazione del blocco.** — Quando il pezzo è bene penetrato di paraffina si fa il rivestimento, prendendo della paraffina fusa e versandola o dentro le forme del LEUCKHART o in una scatoletta di carta resistente; possono servire anche dei cilindri cavi, fatti rotolando della carta intorno ad un pezzo di legno, nel modo già descritto a proposito della celloidina. Le forme del LEUCKHART sono comodissime, e si prestano bene nel maggior numero dei casi.

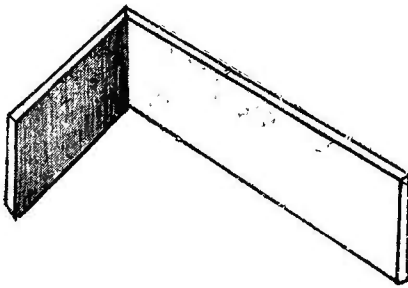


Fig. 6. — Una forma del LEUCKHART.

Constano di due pezzi uguali di metallo foggiate ad angolo retto, con un lato più corto (da 20 a 30 mm.) e l'altro assai più lungo (da 6 a 7 cm.). È opportuno aver due paia di forme, un paio più piccole e l'altro più grandi; le piccole avranno i pezzi di  $20 \times 50$  mm. con l'altezza di 8 mm.; le più grandi di  $30 \times 70$ , alte 10 mm. È importante non servirsi di forme molto spesse, altrimenti la paraffina si raffredda rapidamente alla periferia, facendo così una concavità tanto alla superficie superiore che a quella inferiore del blocco, e ciò può essere di danno al pezzo o ai pezzi che si sono imparaffinati. Uno spessore sufficiente, per forme di ottone, o di altra lega consimile, è quello di 2 mm. Recentemente il FRANKL propose di sostituire al metallo il vetro, e certo la sostituzione è vantaggiosa, ma anche costosa. Quando il pezzo da rivestire lo permette, si preferiscano sempre le forme più basse. Aggiustate una contro l'altra, in modo da costituire una cavità a fondo rettangolare, le forme sono poste su di un pezzo qualunque di vetro, che si è spalmato prima con un leggero strato di glicerina; anche le forme saranno state leggermente lubrificate nello stesso modo. Si mettono bene a contatto fra di loro e con la piastra di vetro, quindi si riempie la cavità con paraffina fusa, poi con una spatolina riscaldata vi si trasporta l'oggetto, e con delle punte, pure riscaldate, lo si orienta nel modo desiderato.

Se l'orientamento non è cosa lunga e difficile basterà aver prima riscaldato un poco il vetro; nel caso contrario bisognerà tenerlo sopra la stufa, fin che dura l'orientamento<sup>1)</sup>; e quando questo dovesse esser fatto sul microscopio da dissezione si potrà mettere la piastra di vetro con le forme dentro una vaschetta bassa, ripiena d'acqua calda, che si trasporterà sul tavolino del microscopio. Beninteso che il livello dell'acqua calda non deve raggiungere l'orlo superiore delle forme.

Orientato l'oggetto, si lascia un poco raffreddare, quindi s'immerge in una vaschetta piena d'acqua fredda, lasciando allo scoperto la sola superficie superiore; ma appena questa è rappresa si affonda tutto nell'acqua e vi si lascia per una mezz'ora, finchè la massa sia completamente solidificata e raffreddata; allora si stacca facilmente il blocco dalle forme e dal vetro. È di molta importanza che la paraffina si solidifichi rapidamente, con l'aiuto dell'acqua fredda, perchè altrimenti cristallizza, specialmente nella parte centrale, ed allora diventa friabile e non si presta per essere tagliata. Nel caso che si sia fatto l'orientamento dentro la vaschetta con l'acqua calda si leverà quest'ultima con una pipetta, o con un piccolo sifone di vetro, e vi si sostituirà dell'acqua fredda.

Se si tratta di piccoli oggetti, come per esempio uova o larve di animali, si può fare l'imparaffinamento anche dentro un vetro da orologio, nel quale si versano la paraffina e gli oggetti, dopo averlo leggermente spalmato con glicerina. Si mette a galleggiare nell'acqua fredda, per poi ritagliare, a massa ben solidificata, la parte centrale nella quale sono rivestiti i corpiccioli da sezionare.

Se si tratta di un solo oggetto, facile ad orientare e di piccole dimensioni, riesce bene il semplice metodo proposto dal BORN. L'oggetto si pone, appena estratto dalla paraffina fusa, sulla superficie di un piccolo blocco di paraffina solida e con un ago riscaldato si fa fondere tutto intorno un poco di quest'ultima, in modo da attaccarlo e rivestirlo.

**119. Rivestimento misto.** — Può darsi talvolta che sia necessario fare il rivestimento con la celloidina, ma che occorra fare poi il blocco con la paraffina, o per avere le sezioni sottili, o per farle continue a nastro. In questo caso, dopo formato e indurito il blocco con la celloidina lo si ritaglia, con un rasoio inumidito con alcool a 80 %, per ridurlo alle più piccole dimensioni, consentite dall'oggetto contenutovi, quindi si asciuga leggermente, si passa per qualche minuto

---

<sup>1)</sup> In questo caso, perchè la paraffina non sfugga, s'incollano le forme fra di loro e alla lastra di vetro, con la gomma-sciroppo di APÀTHY. Questa si scioglierà poi nell'acqua.

nell'alcool assoluto, e si trasporta nell'olio di legno di cedro, per poi procedere, secondo i metodi sopra descritti, all'imparaffinamento.

Perchè il rivestimento misto riesca bene, bisogna evitare il soverchio indurimento del blocco di celloidina, la qual cosa si ottiene mettendo l'oggetto nella soluzione di celloidina al 2% e dopo al 3%, o, al massimo, al 4%. Quindi si fa indurire lentamente il blocco (secondo le norme date nel § 117) senza passare alla soluzione densa, 8%.

FIELD e MARTIN<sup>1)</sup> avevano tentato di darci un rivestimento di celloidina e paraffina nello stesso tempo; ma il tentativo non si può dire riuscito. Nè migliori risultati si ottengono con le modificazioni che a quel metodo ha di recente apportato il SAMASSA<sup>2)</sup>. Eccole in breve: Gli oggetti tolti dall'alcool assoluto sono passati in questa miscela: toluolo vol. 2, alcool assoluto 1, etere solforico 1, e dopo qualche tempo trasportati in una miscela identica saturata a freddo con pezzetti di paraffina e di celloidina; qui si lasciano per 24 ore, poi si fa il rivestimento, ma invece d'indurire il blocco coi vapori di cloroformio lo si espone a quelli di etere di petrolio, che agisce più lentamente. Se si tratta di oggetti molto minuti si trasportano con una grossa goccia del liquido su di una lastra di vetro<sup>3)</sup>, si lasciano mezz'ora all'aria, ed allorquando alla superficie si scorge una pellicola di celloidina si pone la lastra dentro all'etere di petrolio. Quando la massa è indurita si stacca facilmente dalla lastra, e si rimette nell'etere di petrolio per un giorno.

Il blocco è passato poi nell'olio di paraffina e quindi nella paraffina.

Ma neanche con questo metodo si ha un vero rivestimento in celloidina, perchè essa ben difficilmente penetra. D'altra parte va tenuto conto che non si evita il riscaldamento, e vien quindi meno lo scopo principale che ci si propone col preferire la celloidina alla paraffina.

Certo che sarebbe molto comodo se si potesse ottenere un vero e completo rivestimento misto delle due sostanze, ma finora questo risultato non è stato raggiunto.

In conclusione dobbiamo riconoscere che il solo metodo pratico e vantaggioso è quello di fare prima un accurato rivestimento con la celloidina poco densa (3%); e quindi imparaffinare, secondo le norme già date.

---

<sup>1)</sup> In *Bull. Soc. Zool. France*, 19. 1894, pag. 48.

<sup>2)</sup> In *Arch. Entwickl. Mechanik.*, 7. 1898, pag. 2.

<sup>3)</sup> Qui si potrà fare con tutta comodità l'orientamento, anche servendosi del microscopio da dissezione.



Raffreddata la paraffina, il blocco viene tagliato delle dimensioni volute ed attaccato al cilindro di legno che deve entrare nel vano corrispondente del portaoggetti del microtomo. Se, invece di cilindrico, il portaoggetti fosse fatto a morsa, il blocco si attaccherà ad un pezzo di legno qualunque. Ad ogni modo, per far aderire il blocco alla superficie del legno, basta riscaldare alla fiamma un vecchio bisturi e quindi fondere un poco la paraffina intorno al blocco, finchè esso s'attacca alla superficie del legno. Quando si adoperano i microtomi rapidi, nei quali il blocco dev'essere attaccato al portaoggetti di metallo (come, per esempio, nel microtomo a bilico), è più sicuro riscaldare quest'ultimo a 70°-80° C., appoggiarvi sopra il blocco ed immergere tutto nell'acqua fredda; così l'adesione del blocco al portaoggetti è molto salda.

## CAPITOLO X.

### Modo di fare le sezioni. Coltelli e microtomi.

**120. Coltelli.** — Per fare delle fette occorre, con o senza microtomo, avere un coltello; per fare delle fette sottili bisogna che il coltello sia affilato molto bene; e per ottenere fette sottilissime è necessario che il coltello sia di acciaio molto duro, taglientissimo, e con il filo senza la più piccola tacca. Per riconoscere se il filo è dritto si metterà il coltello sotto al microscopio e si farà scorrere a poco a poco in tutta la lunghezza, esaminandolo diligentemente con un debole ingrandimento. Perchè il coltello possa dirsi taglientissimo bisogna ch'esso recida facilmente un capello sottile, tenuto liberamente sospeso fra due dita, ad uno degli estremi.

Se il coltello ha delle intaccature, anche piccolissime, nel fare sezioni delicate si troveranno delle porzioni cellulari (nucleoli, cromosomi dei nuclei in mitosi, ecc.) trascinate fuori di posto; se il filo è perfetto, ma un poco grosso non sarà possibile nè fare sezioni sottilissime, nè ottenere delle buone sezioni a nastro continuo, perchè esse saranno molto compresse.

Aver dunque un coltello veramente buono è cosa importantissima per un istologo, ma è anche molto difficile. Perciò non sarà male trattenerci su questo punto, che a qualcuno potrà parere molto volgare, ma che io sono convinto che rappresenta una delle più grandi difficoltà della tecnica istologica.

Prima di tutto è necessario che il coltello sia di buona qualità. Nei microtomi a slitta, qualunque sia il modello, si usano di solito dei coltelli fatti *ad hoc*, cioè molto larghi e molto spessi, ed uno dei più noti fabbricanti è il WALB, di Heidelberg, ma i suoi coltelli non

sono sempre molto buoni, nè per la qualità dell'acciaio, nè per la tempra, come lo erano un tempo; migliori sono quelli di HERMANN HAERTEL di Breslau (Weidenstrasse, 33).

Per il microtomo occorrono sempre coltelli di acciaio ottimo e di tempra durissima, condizione necessaria per avere il filo molto fino, non tondo. Nei microtomi rapidi si usa spesso un rasoio, che del resto può essere adattato anche ai microtomi a slitta e in qualche caso servire in sostituzione dei coltelli grandi. Ora non è tanto difficile trovare rasoi buoni, cioè con filo taglientissimo o di tempra dura, specialmente in quelli di Sheffield; soltanto bisognerà evitare che il rasoio sia di poco spessore, perchè sarebbe troppo elastico, e quindi inservibile. Ma, pur troppo, per quante cure si abbiano, nel tagliare oggetti duri, o per la presenza di qualche granello, o per qualche inavvertenza, il filo si guasta; ed allora bisogna rimediare con una nuova affilatura. E qui s'incontrano le maggiori difficoltà. Avviene intanto che alcuni coltelli sono temperati molto duri sul filo, ma non oltre, in modo che quando questo è consumato diventano poco resistenti ed allora è facile affilarli, ma col filo tondo.

Affilare bene un coltello da microtomo è cosa ardua, e tanto più quanto maggiori sono le dimensioni della lama.

Bisogna prima di tutto ricordarsi, che i soliti arrotini ed anche i costruttori di stromenti chirurgici *non* sono capaci, generalmente, di affilare bene i coltelli da microtomo, e che non di rado possono rovinarli. Rimandare il coltello al fabbricante è certamente un buon rimedio, ma talvolta può accadere che la visita doganale al confine ci faccia arrivare le lame con dei denti di qualche centimetro <sup>1)</sup>. Occorre, in conclusione, provvedere da sè, e, a forza di pazienza e di buona volontà, diventare buoni affilatori dei propri coltelli. D'altronde quelli grandi, che sono i più difficili da affilare, hanno una lunghezza di filo rilevante, sicchè anche guasti in uno o due punti restano ancora servibili; i rasoi poi sono di affilatura più facile. Si deve raccomandare la massima diligenza, perchè il filo non venga mai urtato da corpi duri, e sarà bene sostituire ai coltelli da microtomo un rasoio usuale quando si debbano sezionare dei pezzi che possono contenere nel loro interno delle sostanze d'una durezza rilevante. Quando non si adoperano, i coltelli saranno leggermente unti con della vaselina e riposti nei loro astucci; quando devono essere adoperati si asciugano con un pezzo di tela vecchia ben pulito.

**121. Affilatura dei coltelli.** — Bisogna distinguere secondo che si tratta di rasoi o di coltelli speciali da microtomi. Per i primi,

---

<sup>1)</sup> Un buon affilatore di coltelli da microtomi è il sig. GIUSEPPE RIEGEL, Acquario, Napoli.

anche non riuscendo ad affilarli bene da sè, non è difficile trovare dei barbieri capacissimi di farlo, e ad essi si potrà ricorrere. Ma anche in questo caso si dovrà aver sempre nel laboratorio un cuoio da affilare, e fra i moltissimi che sono in commercio si darà la preferenza a quelli dello ZIMMER di Berlino, che sono fissati su di un parallelepipedo, una delle facce del quale è ricoperta da una pasta dura, che serve per levare le tacche (n. 1), un'altra da un cuoio ruvido di color rosso (n. 2), un'altra da un cuoio nero più fino (n. 3) e la quarta da una sottile pelle bianca (n. 4). Sul n. 2 e 3 si stende un poco di pasta da rasoi, con dell'olio, il n. 4 si adopera asciutto. Volendo semplicemente ripassare il rasoio lo si striscia col dorso all'innanzi, sul n. 3 per tutta la lunghezza del cuoio, e giunti alla fine si volge il rasoio, per farlo toccare con la



Fig. 7. — Cuoio da affilare, montato su di un sostegno di legno (modello ZIMMER).

superficie opposta, e si retrocede, strisciando nello stesso modo. L'asse del rasoio resti un poco obliquo in confronto di quello del cuoio, in modo che nello strisciamento tutta, o quasi, la lunghezza del filo sia posta a contatto col cuoio. Dopo ripetuto per 20-30 e più volte questo movimento, si asciughi diligentemente con un cencio pulito il rasoio e si ripeta l'operazione sul n. 4.

È stato detto, ma non so se a ragione, che, invece di strisciare sul cuoio, sia meglio dare rapidamente dei piccoli colpi vibrati, tenendo il coltello molto obliquo e facendogli toccare per breve tratto la superficie del cuoio. In questo modo invece di un filo dritto continuo si avrebbe un filo leggermente ondulato nel profilo, e questa sarebbe condizione vantaggiosa quando si debbono fare delle sezioni rapidamente.

Se il rasoio ha delle tacche non basta certo ripassarlo sul cuoio, e si può provare a servirsi del lato n. 1 facendo il movimento *contro filo*, cioè (all'opposto di quello che si è detto prima) col filo in avanti, nella direzione del movimento.

Ma in questo caso è meglio addirittura ricorrere alla pietra da affilare; di queste ce ne sono di diverse qualità, ed è molto importante prenderne una buona, cioè di grana molto fina. Le solite pietre da rasoi sono tenute unte con l'olio, ma possedendone una di buona è preferibile bagnarla con l'acqua e glicerina, od anche con l'acqua sola. Le migliori pietre provengono da Norimberga o da Lipsia.

L'affilatura del rasoio sulla pietra si fa nel seguente modo: si passa prima un certo numero di volte contro filo da una parte e dall'altra, finchè le ripiegature del filo sieno scomparse; si tiene la pietra abbondantemente bagnata con acqua e si fa il movimento con una certa forza, ma lentamente, per non produrre al metallo un riscaldamento che ne diminuirebbe la tempera. Dopo questa prima operazione si osserva il filo al microscopio, con un debole ingrandimento, e se vi sono intaccature sensibili bisogna levarle nel modo seguente: il rasoio si appoggia col filo sulla pietra in posizione verticale e con moto leggero si procede di traverso in modo che il filo resti sempre a contatto con la pietra pur cambiando di posto, la qual cosa è necessaria per non produrre un solco sulla pietra stessa.

Dopo pochi movimenti si torna a mettere il rasoio di piatto e si dà qualche colpo ancora a controfilo, per quindi osservare nuova-

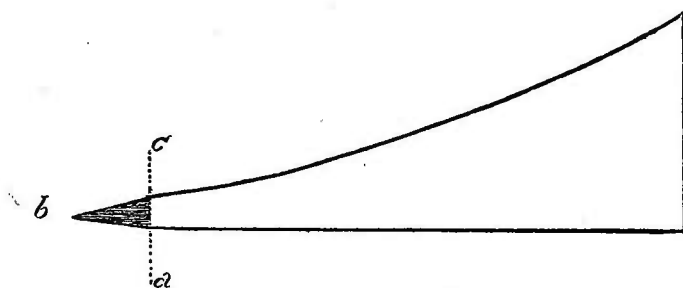


Fig. 8. — Sezione schematica del coltello.

*b a. e b c.* superficie secondarie che si formano con l'affilamento.

mente al microscopio se le tacche sono scomparse. Quando questo risultato è ottenuto si ripassa a controfilo parecchie volte, per ridurre il taglio uniformemente sottile, e quindi si passa sul cuoio n. 3 e poi sul n. 4, beninteso procedendo adesso col dorso del coltello all'innanzi.

Per affilare i coltelli da microtomo le difficoltà aumentano moltissimo. Prima di tutto occorre avere una pietra molto buona, di gran fine è assai più grande di quella che serve per i soliti rasoi. De resto le operazioni da farsi sono le stesse, ma riescono più difficili a cagione della mole e del peso del coltello. Si avverta che prima di cominciare l'affilamento si dovrà infilare sul dorso del coltello quel pezzo foggiato a gronda (in tedesco chiamato *Abziehvorrichtung*), che ha lo scopo d'innalzare la schiena, e quindi far appoggiare il filo sulla pietra. Si noti a questo proposito che il coltello ha la superficie inferiore piana, quella superiore concava; di modo che la sezione (vedi fig. 8) si presenta come un triangolo mistilineo, con due lati presso a poco retti (il dorso del coltello e il profilo della faccia inferiore) ed un lato curvo (il profilo della faccia superiore). Or coll'infilare l'*Abziehvorrichtung* è evidente che la faccia superior rimane più sollevata sulla pietra della inferiore; ma ciò è vantag-

gioso, perchè il piano *ba* della fig. 8 si allontanerà meno dalla superficie di sezione dell'oggetto, che corrisponde evidentemente al piano inferiore del coltello tenuto orizzontalmente.

Si avverta che il pezzo che s'infila sul dorso non dev'essere tenuto da una vite centrale, perchè allora può oscillare ai due estremi, danneggiando l'affilatura. Ma è meglio che sia tenuto a sfregamento forzato, senza alcuna vite, cosa che si ottiene facilmente quando si pone una striscia di legno dolce confitta fra il dorso del coltello e la superficie interna del pezzo aggiunto; oppure che sia costruito di due pezzi, come si vede dalla fig. 9 (Catalogo JUNG).

Se nell'affilatura si potesse fare a meno d'innalzare la schiena del coltello, certo che si avrebbe un filo sottilissimo, formato da due facce molto ravvicinate fra di loro, in confronto di quando si affila,

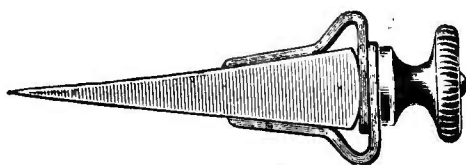


Fig. 9. — Coltello da microtomo in sezione.

Si scorge la sezione dell'*Abziehvorrichtung*, con la vite che serve per fissarlo al coltello.

col pezzo dorsale. Ma ciò non è possibile: ora una delle cause della compressione delle sezioni, notevole quando si usa fare le sezioni continue a nastro, risiederebbe appunto, secondo il MOLL <sup>1)</sup>, in questa brevità e relativa larghezza dell'angolo delle due superficie d'affilamento, o facce di consumo del filo, che sono rappresentate nei tratti *ab* e *bc* della fig. 8.

Dal formarsi, vicino all'orlo del coltello, di quelle due superficie secondarie di affilamento, deriva questo inconveniente: quando vogliamo fare delle sezioni molto sottili, e il coltello ha la faccia inferiore orizzontale, il filo passa sopra alla superficie di sezione senza tagliare. A questo grave inconveniente ripara il *reggi-coltello* di APÀTHY, del quale è detto più innanzi (§ 128).

Invece che sulla pietra, i coltelli possono essere affilati su di una lastra di vetro sulla quale si stende una polvere bagnata con acqua. Vi sono parecchie polveri che servono allo scopo, e l'autore ora citato le divide in due categorie: polveri che affilano, e polveri che puliscono. Lo smeriglio sarebbe il tipo delle prime, la calce di Vienna delle seconde. Giova ricordare qui che, secondo il MOLL, il filo del coltello nei microtomi rapidi non dovrebbe essere una retta, ma una

<sup>1)</sup> MOLL J. W., *Das Mikrotom Reinhold-Giltay*, in *Zeitschr. wiss. Mikr.*, 9. 1893, pag. 465.

linea ondulata; vi dovrebbero cioè essere nel filo delle piccolissime intaccature (ma non ripiegature); così si taglierebbe molto più facilmente, e la compressione delle sezioni verrebbe quasi ridotta a nulla. Ora appunto lo smeriglio dà al filo delle notevoli intaccature, mentre con la calce di Vienna rimane perfettamente liscio. Il MOLL reputa che per sezioni molto sottili (sotto ai  $5 \mu$ ) non si debba adoperare nè l'una nè l'altra, ma una polvere che abbia proprietà intermedie fra quelle due; e tali proprietà sarebbero possedute dalle tre polveri seguenti:

1.<sup>o</sup> Ossido di ferro, preparato con l'arrostimento dell'ossalato di ferro, ottenuto dal precipitare a caldo una soluzione di solfato ferroso nell'ossalato ammonico.

2.<sup>o</sup> Ossido di ferro, preparato con l'arrostimento del solfato doppio di ferro e ammonio.

3.<sup>o</sup> Diamantina n. 1 (*non* n. 2), polvere per brunire, di composizione sconosciuta all'autore, che si trova in commercio, e che viene fabbricata in Svizzera.

Sia che l'affilatura venga fatta sulla pietra o sul vetro con la polvere, l'operazione verrà portata a termine col cuoio n. 3 e poi col n. 4. Quando il coltello è bene affilato si potrà tagliare con facilità un capello sottile, tenuto liberamente sospeso ad un capo con due dita; la superficie della paraffina tagliata non mostrerà delle strie, o ne mostrerà solo di sottilissime (vedute con la lente) e tutte eguali fra di loro. Facendo tagli di oggetti non duri ed omogenei, si dovranno ottenere senza fatica sezioni di  $3 \mu$  nei microtomi rapidi, e di  $5 \mu$  in quelli a slitta col coltello obliquo.

**122. Microtomi** — Col rasoio a mano si possono fare delle sottili sezioni, ma non di eguale spessore e continue di tutto un pezzo; quindi da lungo tempo si è cercato di sostituire al libero movimento della mano un moto uniforme, ottenuto con mezzi meccanici. Da ciò l'invenzione dei microtomi, dei quali oggidi se ne contano più di un centinaio. In mezzo a questo gran numero, dove sono i tipi più diversi, non è cosa facile fare una scelta; ma, premesso che non esiste un microtomo universale, e che i bisogni sono diversi a seconda del lavoro da fare e dell'entità del laboratorio, diventa necessario scegliere alcuni tipi e descrivere più di una forma.

Lasciando da parte i primi e più semplici microtomi ed anche quelli che ogni tanto si vedono consigliati come microtomi da studenti e che sono di poca utilità, noi possiamo dividere i microtomi in due grandi categorie: microtomi rapidi per le sezioni continue e microtomi lenti per le sezioni isolate (solo secondariamente questi possono servire per le sezioni continue). Siccome un microtomo universale non esiste, si capisce che nei laboratori ve ne deve esser sempre almeno uno della prima categoria e uno della seconda. Ci

ha mezzi limitati, e non può comperarne più di uno, deve dare la preferenza ad un microtomo lento a slitta.

In generale il microtomo per le sezioni isolate è costituito su questo tipo: un piano rettangolare, orizzontale, di metallo molto pesante e molto grosso serve di base allo stromento. Dalla metà del rettangolo, sull'asse maggiore, s'innalza un piano verticale, a destra del quale è fissato un piano obliquo, che forma col primo un angolo diedro acuto, nell'interno del quale scorrerà la slitta che porta il coltello. Nella parte sinistra prendono posto le altre due parti che, col portacoltello, formano il microtomo, cioè il portaoggetti e la vite

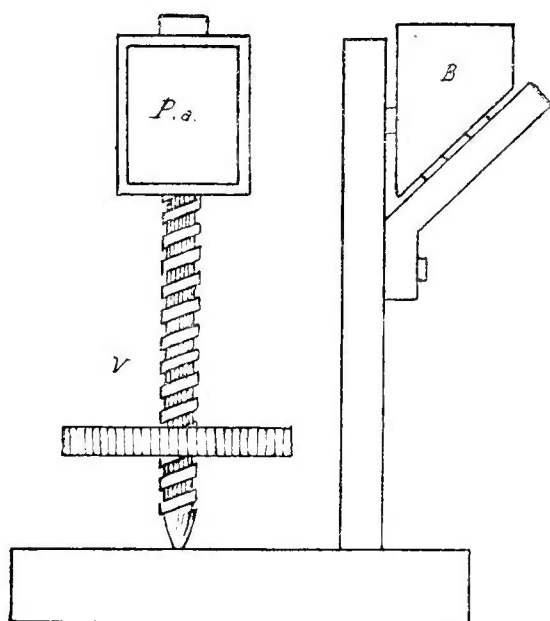


Fig. 10. — Sezione schematica di un microtomo a slitta e ad innalzamento diretto.

*B.*, portacoltello; *V.*, vite micrometrica; *P.a.*, portaoggetti.

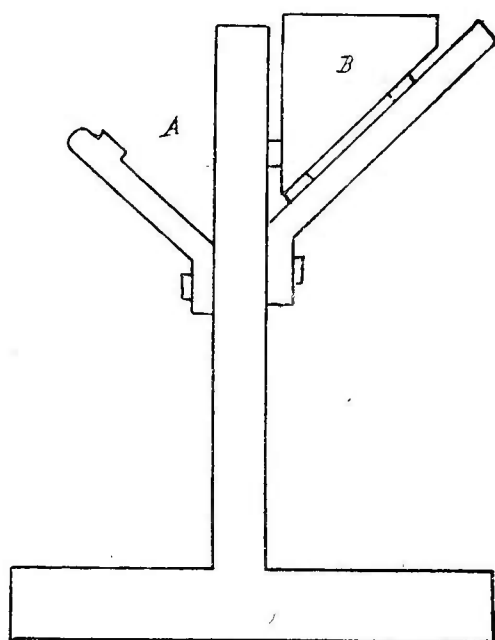


Fig. 11. — Sezione schematica di un microtomo a slitta.

*B.* portacoltello; *A.* spazio per il portaoggetti e per la vite micrometrica.

micrometrica. Ora qui abbiamo due sotto-tipi molto differenti. Il portaoggetti può essere collocato al disopra della vite micrometrica, che è verticale; ed allora l'innalzamento dell'oggetto è fatto direttamente. Si hanno così dei microtomi semplici e di facile uso, ma che non possono dare sezioni molto sottili, come, ad esempio, il notissimo Schanze-Reichert, ecc. (fig. 10). Nel secondo sottotipo, invece, il portaoggetti e la vite micrometrica sono due pezzi distinti, che poggiano su di un piano fissato alla sinistra del piano verticale e simile a quello che sulla destra serve di sostegno al portacoltello, solo che, invece di essere orizzontale, è leggermente inclinato. La vite micrometrica orizzontale spinge avanti il portaoggetti, e questo, camminando su di un piano inclinato, sale avanzando di una quantità che è indirettamente determinata dalla

vite micrometrica (fig. 11). Qui abbiamo i diversi microtomi a slitta, dei quali i migliori sono indubbiamente il THOMA-JUNG, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli, ed il BECKER, forse il più perfetto dei microtomi a slitta. Sono tutti e due essenzialmente costruiti sul tipo schematico or ora descritto, ma nel THOMA-JUNG i piani obliqui che reggono, a destra il portacoltello e a sinistra il portaoggetto e la vite micrometrica, sono di metallo, mentre nel BECKER sono di cristallo. Da ciò la differenza che nel primo occorre dell'olio come lubrificante, nel secondo no; da una parte e dall'altra vi sono dei vantaggi e degli inconvenienti, ma in fondo il BECKER è da preferire, tanto più che questi ha portato al suo microtomo altre utili modificazioni, che mancano al THOMA-JUNG. Così per esempio, nel primo il portacoltello non è fatto muovere direttamente dalla mano, ma col mezzo di una manovella, e ciò facilita e rende molto più regolare il movimento. Il BECKER ha la vite micrometrica a rovesciamento; vale a dire che giunta alla fine della corsa utile essa viene capovolta, con un semplice movimento, di  $180^{\circ}$  e, senza essere mossa, è presentata nuovamente a posto per spingere avanti il portaoggetti. Questo è certo inferiore al portaoggetti del THOMA-JUNG, portaoggetti modificato alla Stazione Zoologica di Napoli, e che, per il tipo di sospensione cardanica e per la forma cilindrica del pezzo che regge l'oggetto, presenta una assai facile e pratica maniera di orientamento. Del resto questo portaoggetti potrebbe applicarsi al BECKER. Un altro inconveniente di quest'ultimo è che tutta insieme la massa del microtomo è troppo alta, cosa scomoda quando si lavora.

**123. Modo di mettere i coltelli nei microtomi a slitta.** — Il coltello può essere messo trasversalmente alla direzione del movimento del portacoltello; in modo da fare un angolo retto con l'asse longitudinale del microtomo corrispondente al piano verticale mediano, ed allora si dice appunto che *il coltello è trasverso*. Il coltello può essere messo in modo da fare un angolo ottuso con quell'asse, prendendo una posizione intermedia fra quella trasversa e la parallela all'asse. In queste diverse posizioni intermedie si dice che *il coltello è obliquo*; e tanto più obliquo quanto più si allontana dalla posizione trasversa per avvicinarsi a quella parallela all'asse longitudinale. Beninteso che a quest'ultima non arriverà mai, perchè allora non potrebbe incontrare col filo l'oggetto da tagliare. La posizione abituale, quando si fanno le sezioni isolate, è quella *obliqua*; si adopera la trasversa solo quando si fanno le sezioni continue a nastro. Quanto più ci si allontana dalla posizione trasversa e tanto più facile riesce di tagliare oggetti duri, ma tanto più facilmente le sezioni si ravvolgono su sè stesse, se si tratta di oggetti imparaffinati. Per quelli rivestiti con la celloidina il coltello si adopra quasi sempre obliquo.



**124. Microtomi rapidi**, detti anche, più o meno impropriamente, automatici. — In questi modelli il coltello è quasi sempre fisso e l'avanzarsi del pezzo è ottenuto con mezzi meccanici diversissimi. Uno dei più noti è quello che ricorda il meccanismo della macchina da encire e che si trova applicato nel microtomo MINOT-ZIMMERMANN. Questo microtomo tuttavia non è da consigliare, perchè è molto costoso e non è esatto; migliore è il MINOT costruito dal BECKER di Gottinga.

Nel grande modello REINHOLD-GILTAY, basato sullo stesso principio, i difetti del MINOT sono completamente corretti; il coltello non è fisso, ma con lo stesso movimento si ottiene che mentre il pezzo va su e giù in un piano verticale, il coltello si avvanza su di un piano orizzontale. Questo microtomo <sup>1)</sup> è certamente il più perfetto e il più bello di tutti; ma è anche il più caro, venendo a costare circa 700 lire.

Molto meno cari e certamente fra i migliori microtomi rapidi sono: quello di CAMBRIDGE, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli, costruito da JUNG di Heidelberg, e che è noto sotto il nome di *microtomo a bilico* (*rocking microtome*); e l'altro recentissimo di J. C. DE GROOT di Utrecht. Il primo è molto più esatto del secondo, ma ha l'inconveniente di servire esclusivamente per la paraffina e di dare sezioni curve; inconveniente, quest'ultimo, completamente trascurabile quando si tratta di piccole superficie, ma sensibile quando si volessero fare delle grandi sezioni. Per queste ultime raccomando il microtomo di DE GROOT, che serve pure con pezzi rivestiti in celloidina e che dà sezioni piane anche grandissime (ne ho fatto senza difficoltà di 5 cm. di lato e 5  $\mu$  di spessore). L'uno e l'altro microtomo sono di costruzione solida e semplice; quello del DE GROOT poi è addirittura semplicissimo, ma non dà sezioni al disotto di 2  $\frac{1}{2}$   $\mu$ , e non sempre lo spessore di esse è costante. Col microtomo a bilico, invece, si possono fare sezioni di qualunque spessore, anche di 1  $\mu$ , e la grossezza rimane costante. Tanto l'uno che l'altro microtomo vengono a costare circa 200 lire.

Dovendo consigliare un acquisto, direi che chi vuol provvedersi di un solo microtomo deve dare la preferenza ad uno a slitta (BECKER oppure THOMA-JUNG); chi può comperarne più di uno deve aggiungere al microtomo a slitta uno rapido, e acquistare il microtomo a bilico, se si occupa specialmente di citologia, e quello di DE GROOT se si dedica in particolare agli studi di morfologia zoologica, quando cioè più di frequente occorrono grandi sezioni di pezzi voluminosi.

<sup>1)</sup> Vedi la descrizione nel già citato lavoro del MOLL.

Nell'uso dei microtomi rapidi è più che mai necessario avere i coltelli taglientissimi; fortunatamente per questi microtomi servono i comuni rasoi, e di questi è molto più facile trovarne di buoni (fra i migliori sono quelli fabbricati a Sheffield, Inghilterra), ed è anche più facile ridare loro il filo, quando si sono guastati, in confronto dei grandi coltelli dei microtomi a slitta.

Per ben tagliare con i microtomi rapidi occorre che il rivestimento sia fatto molto bene, con paraffina dura (58-60° C.), e che il laboratorio abbia una temperatura di 20° C. almeno, meglio se di 22-23° C.

Il vantaggio del microtomo rapido è grandissimo quando si devono avere tutte le sezioni di un oggetto non piccolissimo. Se l'imparaffinamento è stato fatto accuratamente e se il coltello è bene affilato, si possono tagliare in breve tempo degli oggetti lunghi anche varii centimetri. Certamente è necessario, dopo, perdere del tempo per attaccare un così gran numero di sezioni; ma anche qui l'operazione è molto più rapida che non con i microtomi a slitta, perchè invece di dover attaccare delle sezioni una alla volta, si attaccano le strisce di sezioni, tagliate della lunghezza corrispondente a quella del coprioggetto.

È il caso di ricordare qui un inconveniente delle sezioni continue a nastro e che consiste in una contrazione della superficie sezionata. Il RAWITZ, ha notato che tale fenomeno altera sovente i rapporti di forma degli organi; così, per esempio, un tubo a sezione circolare apparirà a sezione ovale. Ma evidentemente il RAWITZ s'è servito d'un microtomo a slitta, anzi probabilmente del THOMA-JUNG, dove il portacoltello è mosso direttamente dalla mano, e in questo caso si ha realmente una notevole compressione. Ma con i microtomi rapidi, quando si sappia fare il movimento della manovella *a tempo*, cioè in maniera uniforme e regolare, l'inconveniente è molto diminuito e trascurabile anche per sezioni larghe dei centimetri. Il LEE attribuisce la compressione al coltello poco tagliente, e certamente anche questa causa ha una parte, e l'ha ancora più la forma del filo, come ha notato il MOLL, ed ho più sopra (pag. 85) ricordato. Ma che la maniera con la quale si fa il movimento abbia, più di tutte le altre cause, una grande importanza, lo dimostra un'esperienza ovvia. Se col microtomo rapido faccio un movimento secco, brusco e irregolare ottengo delle sezioni contratte sensibilmente; se invece continuo con un movimento dolce e uniforme, le sezioni sono pochissimo compresse.

Con i microtomi rapidi accade anche non di rado che il nastro delle sezioni rimane fesso longitudinalmente; e questo noiosissimo inconveniente ha la sua origine in qualche difetto del filo del rasoio. Finalmente devo ricordare che il nastro delle sezioni spesso si elettrizza fortemente di elettricità negativa e con tanta maggior facilità

quanto più le sezioni sono sottili. Questo fenomeno è sovente causa di seccature, perchè dei pezzi di nastro si agitano, si sollevano e poi si attaccano fortemente alle superficie metalliche, e così possono guastarsi. Ch'io mi sappia, finora non si è rimediato a questo elettrizzarsi del nastro.

Quando si è preparato il blocco di paraffina, tagliato e messo a posto, nei microtomi rapidi, anche se la paraffina è molto dura e purchè la temperatura del locale sia adatta, si potranno fare senz'altro le sezioni, che si attaccheranno facilmente in un nastro continuo, purchè siano sottili, cioè da  $7 \mu$  in giù. Ma se si devono fare sezioni più grosse di  $8 \mu$  bisognerà aggiungere, esternamente al blocco, dell'altra paraffina più tenera ( $40-45^{\circ}\text{C.}$ ) fusa e riscaldata fino ad una temperatura superiore a quella di fusione della paraffina dura, in modo che la paraffina molle aderisca bene a quella dura e formi come una sottile rivestitura.

**125. Microtomo Becker.** — Questo costruttore ha anche un modello sul tipo Schanze, ma di esso non vale la pena di parlare.

Descrivo invece brevemente il modello a *slitta*. Come ho già detto, esso consta delle parti accennate nella descrizione generale. Un basamento di metallo sul quale s'innalza verticalmente un piano longitudinale mediano; a destra di questo il portacoltello, che appoggia, con delle piccole punte di avorio, su di una slitta di cristallo; a sinistra la vite micrometrica, e il portaoggetti, scorrente anch'esso su di una slitta di cristallo. Il portaoggetti è fatto a morsa e con delle viti laterali si può girare in due sensi per ottenere l'orientazione del pezzo. Ma ho già detto che questo si ottiene meglio col portaoggetti del tipo THOMA-JUNG. Il portaoggetti stesso è attraversato nella sua parte inferiore da un sottile e lungo cilindro, che può essere fermato con apposite viti. Questo cilindro corrisponde esattamente alla punta della vite micrometrica, la quale, come ho detto, è a rovesciamento; vale a dire che giunta alla fine della corsa non ha bisogno di essere riportata nella posizione primitiva e poi avvicinata nuovamente con la punta al portaoggetti. Questo è un inconveniente del microtomo THOMA-JUNG, soppresso nel BECKER col rovesciamento. Basta premere un poco sulla parte estrema del reggi vite, perchè questa descriva un arco di  $180^{\circ}$  e si presenti con la punta opposta di fronte al portaoggetti. Per metterla a contatto con questo senza muoverlo, basterà allentare le viti che stringono il sottile cilindro di acciaio e spingerlo dolcemente indietro, fino a mettersi in contatto con la punta della vite micrometrica. Allora si torna a stringere le viti e si continua a tagliare, senza perdere una sola sezione e senza che la prima riesca più spessa delle seguenti. Giunti alla fine della corsa, si ripete il rovesciamento, e così la prima punta della vite micrometrica si presenta verso il portaoggetti, col quale viene messa a

contatto spingendo fino ad essa il cilindro d'acciaio. Per lo spessore delle sezioni si adopera la leva, che si mette in corrispondenza con le tacche, accanto alle quali sono segnati dei numeri, che corrispondono a dei  $\mu$ .

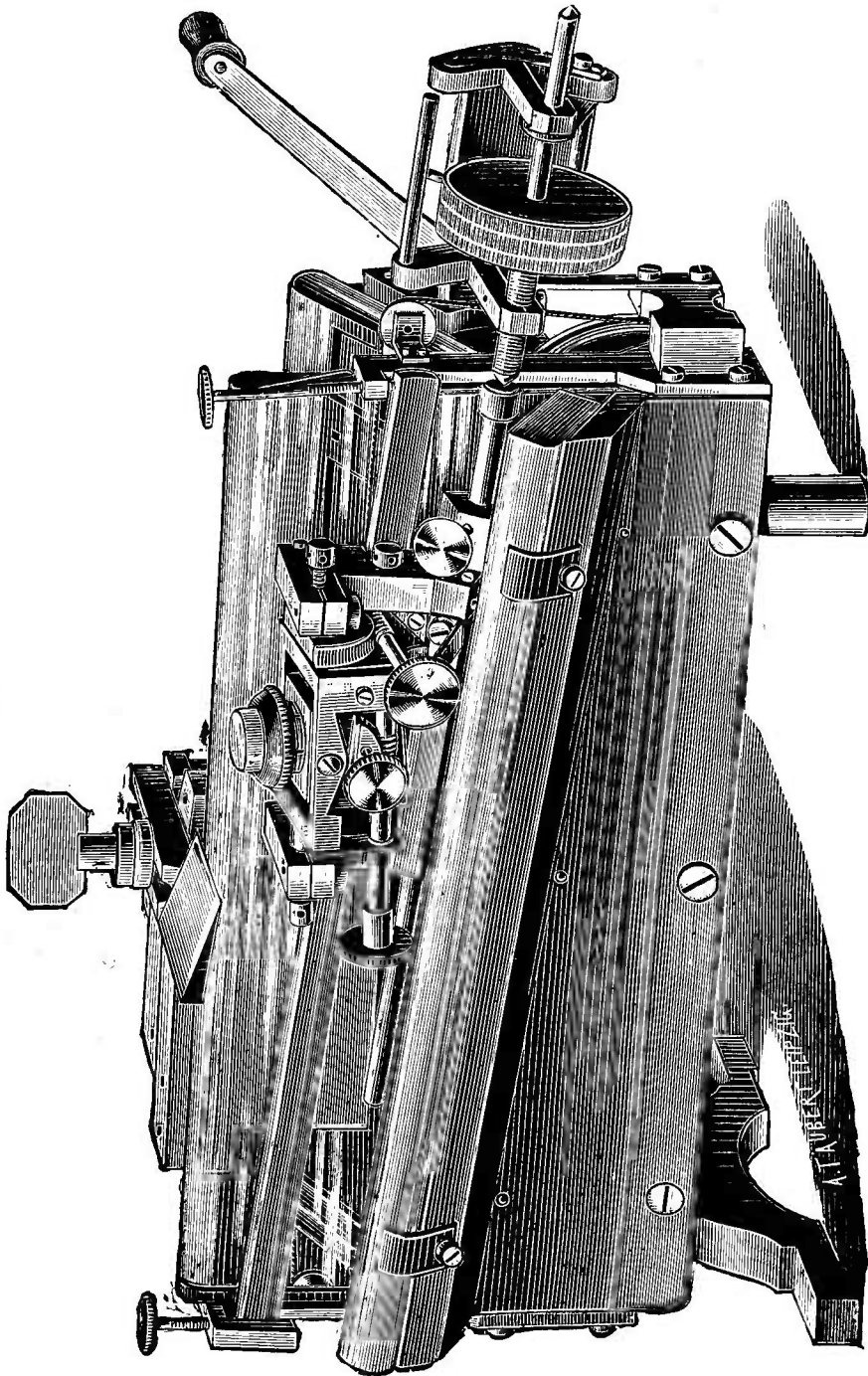
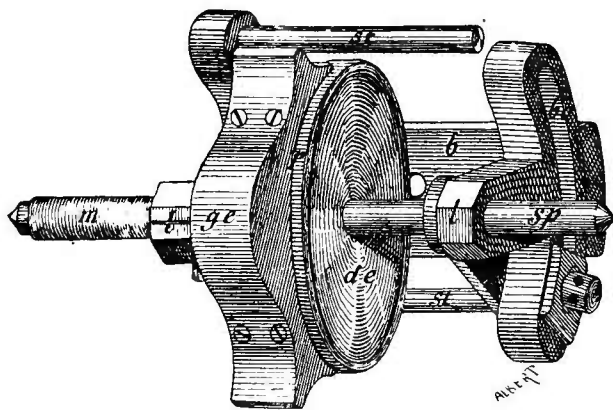


Fig. 12. — Microtomo BECKER.

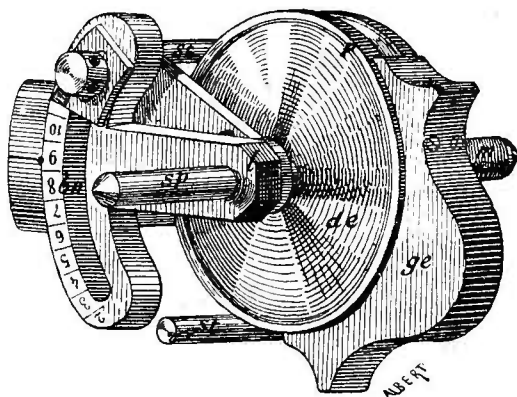
Le figure 13, 14 e 15 mostrano la forma della vite micrometrica ed il congegno interno, del quale essa è provvista, per ottenere il rovesciamento.

Il coltello piccolo, da adoperare trasverso per le sezioni continue, si mette a posto facilmente sul porta coltello; per quello più grande

obliquo è forse più opportuno servirsi del reggicoltello (da non confondersi con portacoltello), del quale dirò più avanti. Il portacol-



A



B

Fig. 13. — Vite micrometrica del BECKER.

Fig. 14. — La stessa, dopo rovesciata.

tello non dev'essere mosso direttamente dalla mano, ma col mezzo di una cordicella e di un volante, che viene messo in moto da una ma-

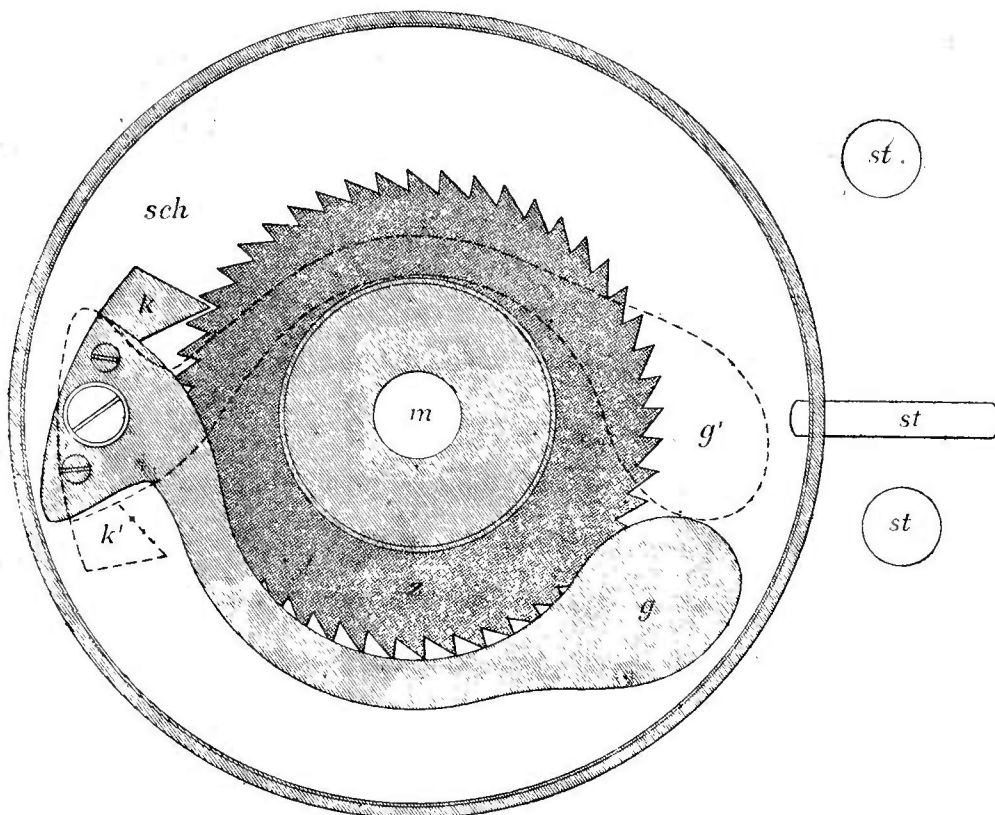


Fig. 15. — Interno del tamburo *de* della vite micrometrica a rovesciamento, ingrandito.

novella. La posizione di questa può essere cambiata, quando nel muoverla urtasse contro il manico del coltello.

Sulle parti a sfregamento non occorre l'olio, ma è necessario tenere il microtomo sempre al coperto dalla polvere. Ogni qualvolta lo si adopera bisognerà pulire accuratamente i piani di cristallo per

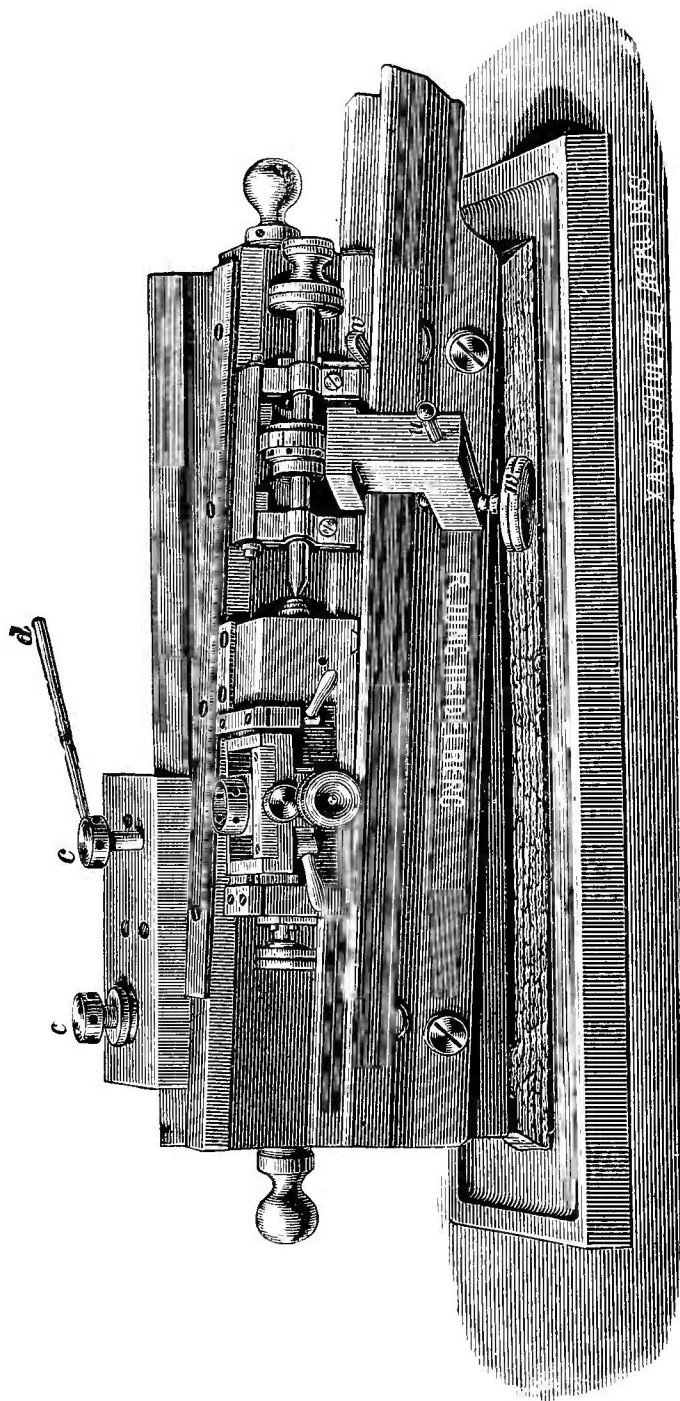


Fig. 16. — Microtomo a slitta THOMA-JUNG, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli.

impedire che le punte di avorio, con l'aiuto di qualche granello, abbiano da incidervi delle strie.

Il microtomo BECKER, provvisto anche di coltelli (non sempre buoni) del WALB costa all'incirca, tutto compreso, lire 400.

**126. Microtomo Thoma-Jung.** — Anche qui abbiamo una base, un piano verticale mediano, e due piani, uno a destra ed uno a sinistra, che incontrano sotto un angolo acuto il primo, tutti in metallo pesante. A destra il portacoltello, che appoggia per tre punti e si muove a sfregamento; occorre quindi tener bene unte con olio leggero (olio d'ossa) le superficie di contatto. Ho già detto che questo è un inconveniente del microtomo THOMA, perchè, essendo il coltello mosso a mano, occorre una grande pratica per esercitare uno sforzo sempre eguale ed avere quindi le sezioni esattamente dello stesso

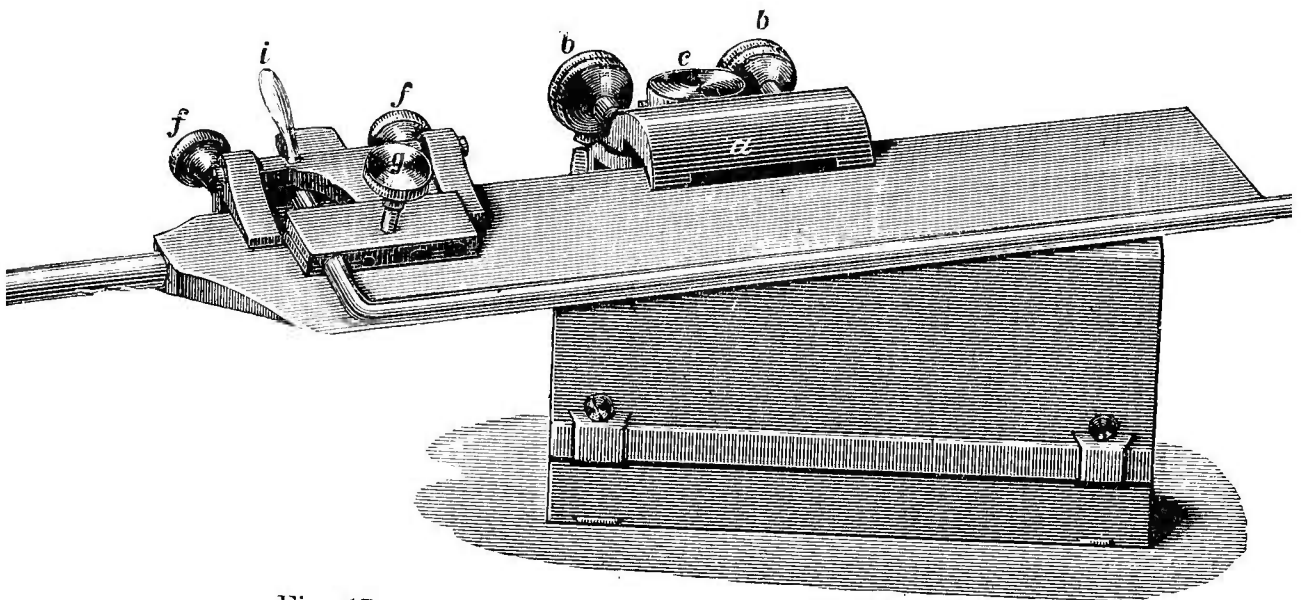


Fig. 17. — Portacoltello del microtomo THOMA-JUNG.

Il coltello è tenuto a posto dal reggi-coltello *a*, vecchio modello. Sopra il coltello si vede un'appiana-sezioni *g*, *f*, *l*, *e*.

spessore. Al portacoltello si applica un coltello (fig. 16) fermato dal reggi-coltello (*a*, *b*, *c*, fig. 17).

Il portaoggetti, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli, è molto opportuno per orientare il pezzo, e per variare l'orientazione con facilità, quando ci si accorgesse, durante il taglio, della necessità di farlo. Basato sul principio della sospensione cardanica, esso ha una cavità cilindrica, entro alla quale si colloca, e si ferma con una vite, il cilindro che porta l'oggetto imparaffinato. Siccome di questi cilindri ne occorrono parecchi, perchè può far comodo di sospendere di tagliare un dato pezzo, per sezionarne un altro, così è meglio costruire al tornio dei cilindretti di legno forte, che corrispondano esattamente alla cavità cilindrica del portaoggetti. Avverto anche che chi si volesse provvedere dal JUNG del microtomo THOMA e di quello rapido a bilico, deve esigere dal costruttore che i cilindretti metallici pieni (*C* della fig. 21) siano esattamente servibili per i portaoggetti di tutti e due i microtomi; può occorrere infatti non

di rado che un pezzo, cominciato a tagliare nel microtomo a slitta, debba venire sezionato in seguito in quello rapido; o viceversa.

Dopo che con le due teste di vite si è orientato a volontà il cilindro con l'oggetto, si fermeranno i due movimenti del portaoggetti stringendo le due leve apposite.

La vite micrometrica è portata da un sostegno che si ferma al piano inclinato mediante una grossa vite. Per regolare lo spessore



Fig. 18. — Coltello per il microtomo THOMA-JUNG.

L'estremità cilindrica s'infilava nel manico (fig. 19) quando il coltello dev'essere affilato.

delle sezioni si fanno corrispondere le due metà del tamburo della vite micrometrica in modo di avere gl'intacchi e i numeri corrispondenti. Tenuto presente che il passo della vite, cioè un intero giro, spinge il portaoggetti di un tratto che corrisponde all'innalzamento di  $15 \mu$ , quando il tamburo è messo in modo che corrisponda sulle due metà il n. 1, avremo un colpo ogni giro e quindi sezioni di  $15 \mu$ . Facendo

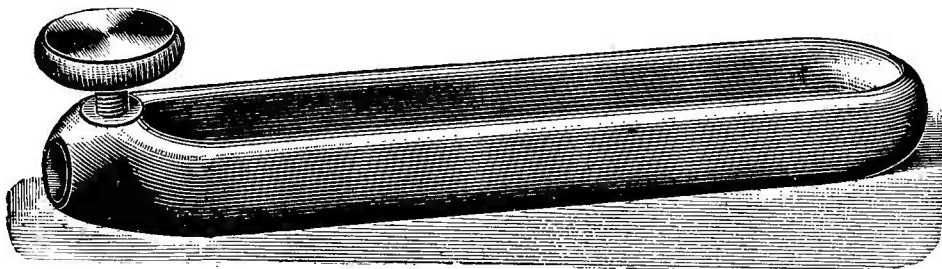


Fig. 19. — Manico in legno, con vite, per affilare il coltello della fig. 18.

coincidere il 2, avremo due colpi ogni giro e, ad ogni colpo, la sezione di  $7 \frac{1}{2} \mu$ . Col 3 abbiamo tre colpi ogni giro e quindi con due colpi sezioni di  $10 \mu$ , con un sol colpo sezioni di  $5 \mu$ . Così di seguito fino a 15, nel qual caso ad ogni colpo abbiamo  $\frac{1}{15}$  di giro, cioè delle sezioni di  $1 \mu$ .

Quando la vite micrometrica è esaurita, si solleva con un dito la leva e con l'altra mano si fa girare alla rovescia la vite, per riportarla tutta indietro; quindi si allenta la grossa vite che fissa il pezzo e lo si trasporta con attenzione fino a ristabilire il contatto fra la punta della vite e la testa d'agata del portaoggetti.

Il prezzo del microtomo THOMA-JUNG (non si prenda il modello piccolo, ma quello medio o grande), provvisto di coltelli, e se ne devono avere due di mezzani ed uno di grande, corrisponde, tutto compreso, a quello del BECKER, cioè all'incirca 400 lire.



**127. Avvertenze sul modo di fare le sezioni in paraffina.** — Se le sezioni devono essere fatte col coltello obliquo si dovrà ritagliare il blocco di paraffina in modo che l'oggetto resti nell'interno di un prisma triangolare; avremo dunque che la superficie di sezione sarà un triangolo. Verso il filo del coltello si presenterà un angolo, in maniera che a sezione compiuta il filo del coltello corrisponda ad un lato. Sarà bene anche che le facce del prisma non siano molto vicine all'oggetto, ma tagliate in modo che resti un certo tratto di paraffina fra il contorno dell'oggetto e quello del blocco. Dopo ritagliato, questo viene messo sul portaoggetti del microtomo, e quando sia stato orientato nel modo voluto si stringono tutte le viti e ci si assicura che tutto è a posto. È necessario che l'ambiente del laboratorio abbia una temperatura proporzionata a quella di fusione della paraffina, come abbiamo già detto.

Il coltello, ben pulito e fermato obliquamente verrà messo in movimento con regolarità; si osserverà sulla superficie di sezione della paraffina se vi sono striature notevoli, le quali dimostrerebbero che il coltello ha bisogno di essere affilato. Nel fare le sezioni, specialmente se l'ambiente non è abbastanza riscaldato, si vedrà ch'esse si avvolgono su sè stesse, e tanto più facilmente quanto più il coltello si allontana dalla posizione trasversale e s'avvicina ad una parallela all'asse longitudinale; ad ogni modo questo avvolgimento più o meno si ha sempre. Come evitarlo? Furono inventati diversi *spiana-sezioni* (vedine uno nella fig. 17), ma forse meglio è non adoperarne alcuno e ricorrere a questo espediente. Con un piccolo pennello molto morbido ed inumidito si distende la sezione appena comincia a avvolgersi e non ancora si è finito di tagliarla. Distesa questa prima parte, si riprende il movimento del coltello, per terminare il taglio, e senz'altro la sezione rimane distesa. Se questo non succedesse completamente non vi è bisogno di niente, perchè nella successiva operazione di attaccare le sezioni sul vetro (capitolo XI) si potrà con tutta facilità completare di distenderle. Oppure si può portare la sezione, parzialmente ripiegata, nell'acqua ed alcool forte a parti eguali in un vetro da orologio e riscaldare leggermente finchè col calore la sezione si distende. Ciò fatto si potrà metterla sul vetro.

Per maneggiare le sezioni bisogna usare molti riguardi: esse si potranno prendere con un ago, o con una pinzetta, od anche, semplicemente, per adesione, col pennello inumidito, ma non bagnato. Quando si prendono con l'ago o con la pinzetta si dovrà evitare di toccarle sul tratto dove c'è l'oggetto sezionato, ma si prenderanno dov'è la sola paraffina.

**128. Sezioni molto sottili e di oggetti friabili.** — Esse sono sempre difficili, anche se l'imparaffinamento è stato fatto con cura.

Un espediente molto vecchio, ripubblicato dal RABL, è il seguente. Tagliata la sezione si fa avanzare il pezzo della quantità desiderata e si spalma mediante un bastoncino di vetro bene riscaldato, con della paraffina piuttosto tenera ( $50-52^{\circ}$ , quando il pezzo è rivestito con quella dura) e che si sarà riscaldata 10-15 gradi sopra il suo punto di fusione, la superficie di sezione. In un momento essa sarà rappresa e raffreddata; allora si farà il taglio e la sezione sostenuta dallo strato aggiunto di paraffina rimarrà intera anche se è molto sottile.

Questo stesso espediente può usarsi anche sostituendo allo strato di paraffina il collodio. In un piccolo recipiente, che si possa chiudere con facilità (per esempio uno di quei vasetti che invece del tappo hanno un cappello di vetro smerigliato) si pone del collodio molto allungato con etere. Con un pennello affilato se ne prende

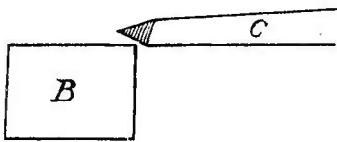


Fig. 20. — Posizione orizzontale del coltello *C*; *B*, blocco da tagliare. L'estremità scura del coltello corrisponde alle due superficie secondarie di affilamento.

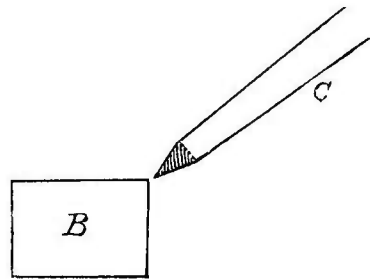


Fig. 21. — Posizione inclinata del coltello *C* sul blocco *B*. L'inclinazione è esagerata.

una piccolissima quantità ed immediatamente si distende sulla superficie del taglio. Bisogna evitare che il collodio coli sulle superficie laterali del pezzo, quindi se ne prenderà una quantità minima. Il collodio si rapprende in un istante, formando un velo sottile sopra la superficie dell'oggetto. Allora si fa il taglio e si ripete l'operazione. Il collodio non è di nessun danno alle sezioni anche se queste devono essere colorate, perchè è permeabilissimo; e non occorre neanche levarlo, perchè non disturba in nessun modo l'osservazione.

Meglio di tutto, quando si ha materiale delicato e difficile a tagliare, sarà di fare il rivestimento misto, cioè prima con la celloidina, e dopo con la paraffina (§ 119). Si potrà così ottenere sezioni di un solo  $\mu$ , ed avere in buono stato sezioni di materiale friabile poco omogeneo.

Anche col rivestimento misto, e servendosi di un coltello bene affilato, non sempre si riesce a fare sezioni sottilissime, cioè inferiori ai 3  $\mu$ . Ciò è dovuto alla presenza della superficie secondaria di affilamento (vedi il § 121 e le figure 20 e 21), che si forma vicino

filo del coltello. Col solito reggi-coltello, come quello della fig. 17, la superficie inferiore della lama è orizzontale quasi tutta, eccetto la corrispondente superficie di affilamento. In conclusione, il filo si presenta un poco rivolto in alto, come si scorge (con molta esagerazione) nella fig. 20, ed il coltello striscerà sul blocco senza tagliare. Ciò accade, beninteso, soltanto quando si vogliono fare sezioni sottilissime.

Quale sarà il rimedio? Inclinare la lama di un angolo determinato, come si scorge nella fig. 21. L'angolo sarà di  $2-5^{\circ}$  se il pezzo è poco resistente, raggiungerà i  $20-30^{\circ}$  se l'oggetto è durissimo. In quest'ultimo caso il coltello prenderà una posizione che ricorda quella della lama di una pialla da falegname. Per tenere il coltello inclinato occorre un *reggi-coltello* speciale, come quello descritto dall'APÀTHY nei *Zeitschr. wiss. Mikr.*, vol. 14, 1897, pag. 157

**129. Microtomo a bilico, Cambridge-Jung, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli.** — Questo microtomo, uno dei migliori e dei meno costosi fra quelli a tipo rapido, di recente costruzione (1895), è ancora poco noto in Italia; ne darò perciò una descrizione accurata.

Una leva  $h$  (fig. 22), che porta fissato l'oggetto da tagliare alla sua estremità sinistra, si muove sull'asse  $z$  con movimento d'altalena e va su e giù davanti al coltello fissato sul sostegno  $p$ . Col mezzo della minugia (o della catenella) che unisce l'estremità destra della leva con la manovella  $k$ , questa, messa in moto dalla mano destra e spinta fino alla caviglia  $a$ , innalza indirettamente l'oggetto, che è poi abbassato dalla molla  $f 2$ , la cui resistenza era stata vinta dal precedente movimento. L'asse  $z$ , sul quale si muove a bilico la leva  $h$ , riposa in una cavità della leva a ginocchio  $w$ , poggiata sull'asse  $x$ , il lungo braccio orizzontale della quale è imperniato su di una vite micrometrica  $m$ . Il movimento di questa si compie, insieme col sollevamento dell'oggetto, mediante il manubrio  $k$ , che porta un pezzo tagliente il quale, ad un punto determinato, ingrana un certo numero di denti della vite micrometrica, che innalza il braccio orizzontale della leva  $w$ . Conseguenza di questo innalzamento è un'escursione in avanti della parte piegata della leva, che viene a spingere quindi anche la soprastante leva  $h$ , e quindi l'oggetto, in direzione del coltello.

La molla  $f 1$  serve per rendere più esatto il movimento della leva  $w$ .

Il pezzo da tagliare dev'essere imparaffinato con molta diligenza e quando si tratta di sezioni molto sottili, sotto i  $6 \mu$ , sarà da preferire la paraffina dura,  $58-60^{\circ}$  C. Gli oggetti duri non vengono tagliati facilmente, e se nell'oggetto vi è qualche parte di tessuto molto resistente, questo viene spaccato dal coltello. Prima di attaccare il blocco

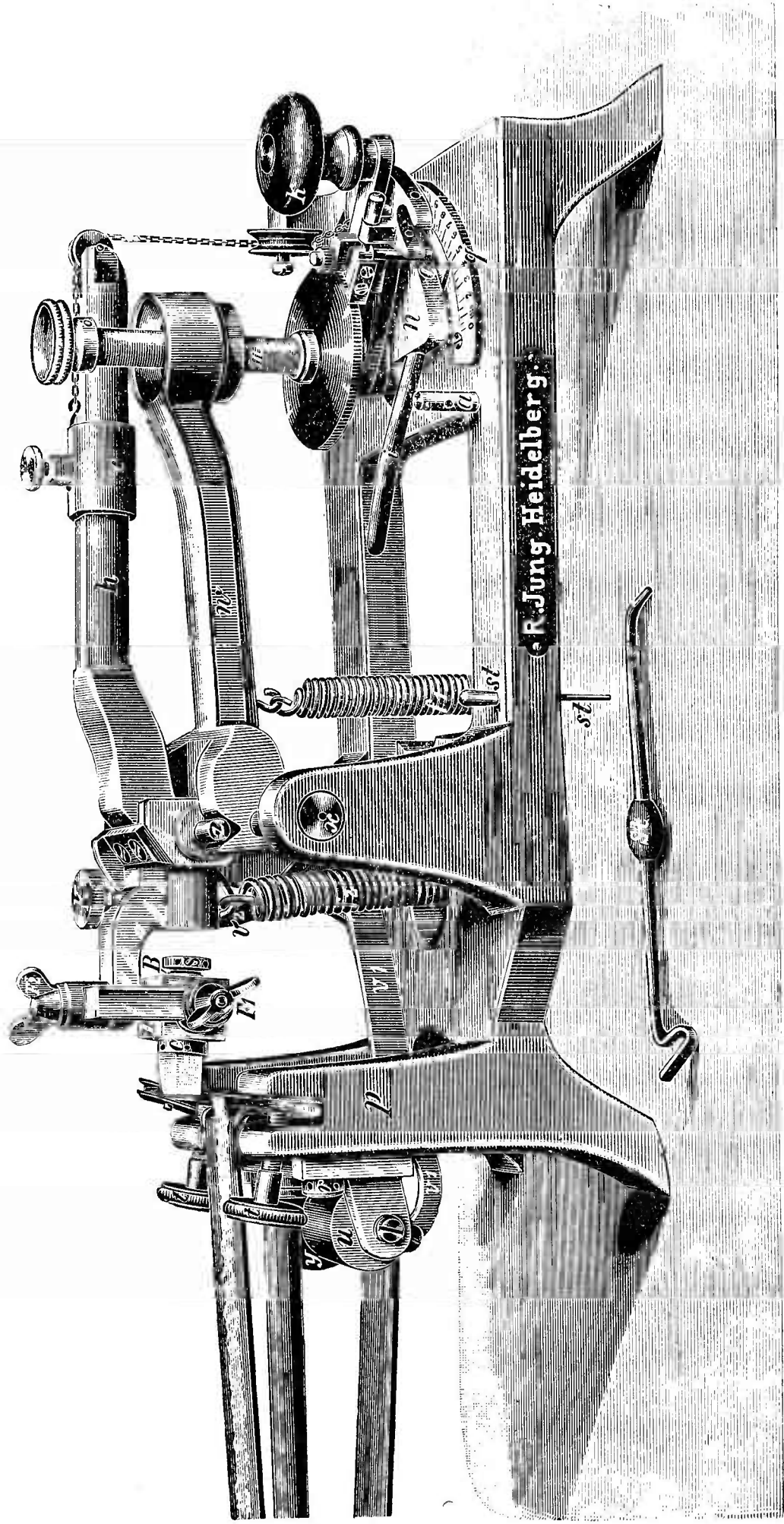


Fig. 22. — Microtomo a bilico, Cambridge-Jung, modificato dalla Stazione Zoologica di Napoli.

di paraffina sul cilindro *C* (fig. 23) del portaoggetti, lo si taglia a forma di parallelepipedo o di tronco di piramide; questa seconda forma è preferibile se l'oggetto ha una lunghezza rilevante. Due facce laterali devono essere parallele fra di loro; la base e la superficie opposta e parallela alla base si tagliano quanto è possibile parallele al piano di sezione desiderato. Ciò facilita molto la definitiva orientazione, che si compie col dado *H*. Nel ritagliare il blocco le due facce, che devono essere parallele al taglio del coltello, verranno fatte quanto più è possibile vicino all'oggetto, in modo che questo trasparisca, ed esattamente parallele fra di loro. Senza quest'ultima con-

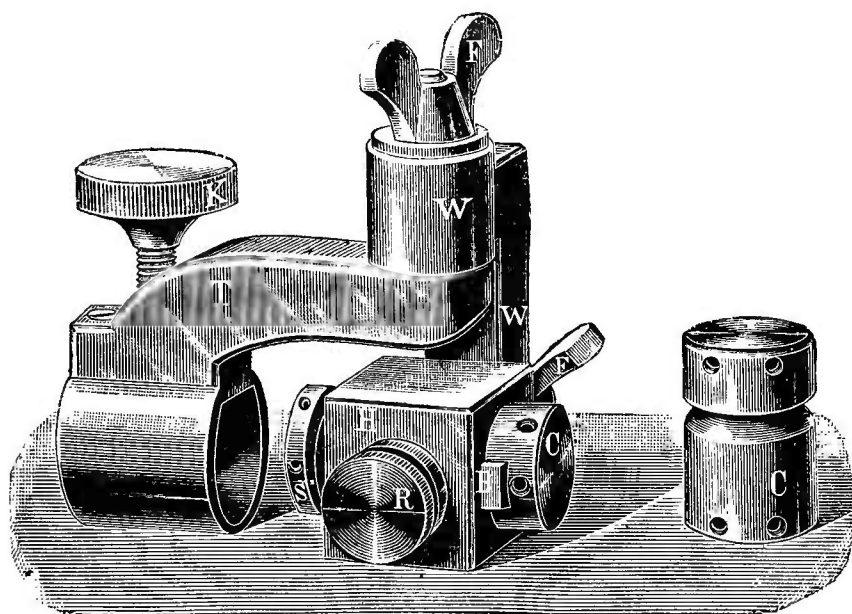


Fig. 23. — Portaoggetti del microtomo a bilico, Cambridge-Jung.

dizione, il nastro delle sezioni non verrebbe dritto, ma curvo, cosa noiosissima per i successivi trattamenti che si devono fare alle sezioni.

Per attaccare il blocco si riscalda il cilindro *C* fino al punto di fusione della paraffina, vi si appoggia sopra il blocco e s'immerge subito il tutto nell'acqua fredda. In questo modo il blocco s'attacca solidamente, senza che si modifichi la direzione della base. Il cilindro *C* è massiccio, e così o il blocco s'attacca bene o non s'attacca del tutto, senza dare dei tentennamenti durante il taglio. Questi cilindri possono penetrare anche nel portaoggetti del microtomo a slitta THOMAS-JUNG, e sarà bene provvederne alcuni, non già uno solo. Si leva il cilindro dall'acqua; lo si asciuga bene, specialmente il foro della vite *S*, con questa si fissa provvisoriamente sul cilindro la guida *B*, e si pone il cilindro dentro al dado *H* del portaoggetti. Nel far questo si deve stare attenti di non tagliarsi, se il rasoio è già fissato al sostegno *p*, e sarà prudente abbassare quanto più si può la

leva  $h$ , mettendo nella posizione di arresto la manovella  $k$ , vicino alla caviglia  $a$  (ciò che si fa col piccolo pioletto di ferro  $st$  infilato sulla base del microtomo), e raccorciando la minugia (o catena) fra il manubrio  $k$  e la slitta  $e$ , col muovere quest'ultima verso sinistra e poi fissandola nuovamente. Introdotto il cilindro, si rimette la slitta  $e$  nella sua primitiva posizione verso destra e reggendo con una mano il manubrio lo si libera dall'arresto, portando il blocco vicinissimo al filo del rasoio. Si allenta la vite  $S$  e col bastoncino di acciaio  $St$  si spinge o si tira il cilindro finchè si colloca il blocco in modo che le due facce parallele di esso vengano ad essere anche esattamente parallele al filo del rasoio. Ciò fatto si chiude la vite  $R$  (che sta dalla parte opposta dell'aletta  $F$  (fig. 22), e allora si fissa sul cilindro la guida  $B$  chiudendo solidamente la vite  $S$ . Se adesso occorre qualche modificazione nell'orientazione del pezzo, per portare la superficie del taglio o più alta o più bassa, o più a destra o più a sinistra, si potrà spostare la posizione del dado  $H$  col mezzo delle due alette  $F_1$  e  $F_2$ ; che si devono muovere una alla volta e con l'avvertenza di non allentarne una finchè l'altra non sia stretta.

Così abbiamo definitivamente orientato l'oggetto, ma per poter fare il nastro di sezioni occorre un'altra operazione. Si allenta la sola vite  $R$ , si toglie dal portaoggetti il cilindro che porta la guida  $B$  e s'immerge rapidamente il blocco, tenuto perpendicolarmente rivolto in basso, dentro la paraffina molle ( $40^{\circ}$  C.) fusa e surriscaldata fino a  $70^{\circ}$  C. Appena fatta l'immersione si toglie e si raddrizza lasciando raffreddare tranquillamente. Così uno strato sottile di paraffina molle si forma intorno al blocco; con un bisturi tagliente si leva quella della superficie del taglio e quella dei due lati non paralleli. In questo modo la paraffina molle rimane solo sulle due facce del blocco parallele fra di loro e al filo del rasoio. Si rimette il cilindro a posto (per levarlo e rimetterlo senza tagliarsi sul rasoio, si tenga conto delle raccomandazioni già date), si chiude la vite  $R$  e, mercè la guida  $B$ , il cilindro si troverà esattamente nella posizione nella quale si trovava precedentemente.

Lo straterello con paraffina molle non è necessario quando si fanno sezioni sottili, cioè dai  $7 \mu$  in giù, purchè la temperatura del laboratorio sia piuttosto elevata.

Ora si può cominciare a tagliare, e non sarà difficile avere il nastro di sezioni purchè il coltello sia molto buono. E non servendo le lame del WALB, si potrà ricorrere a dei buoni rasoi inglesi<sup>1)</sup>. Con movimento uniforme moderato, e con mano leggera, si comincia a muovere il

---

<sup>1)</sup> Il JUNG raccomanda i rasoi di JOSEPH HAYWOOD e C. di Sheffield, Inghilterra.

manubrio  $k$ , andando da destra a sinistra e viceversa e avvertendo di arrivare ogni volta esattamente fino a toccare la caviglia  $a$ . Col mezzo del gambo  $i$ , si può girare il settore  $n$  in modo che il perno  $o$ , durante il movimento del manubrio, si scosti più presto o più tardi dall'orlo del settore e lasci ingranare il suo nottolino nella ruota dentata della vite micrometrica. Sul quadrante  $g$  una scala dà direttamente in  $\mu$  e  $\frac{1}{2} \mu$  lo spessore delle sezioni, e la lancetta posta sul settore si fa coincidere col numero al quale corrisponderà lo spessore desiderato. Si potranno fare sezioni di  $1 \mu$ , di  $1 \frac{1}{2}$ ,  $2$ ,  $2 \frac{1}{2}$ , ecc.. fino a  $20-25 \mu$ . Lo spessore si conserva assolutamente eguale, ed anche quando ci si ferma e poi si riprende a tagliare, non si hanno mai variazioni di spessore, come in altri microtomi.

Il nastro di sezioni si può raccogliere a mano con un ago su di un cilindro, ma ciò è poco comodo, specialmente perchè, come ho già detto, il nastro facilmente si elettrizza; è quindi preferibile acquistare il *porta sezioni*, che si applica mediante le viti  $r r$  a sinistra del coltello, in modo che la rotella e il nastro di cauciù si trovano vicino all'orlo del rasoio. La ruota del portasezioni è messa in movimento mediante un nottolino che s'unisce ad una leva la quale va ad agganciarsi ( $v$ ,) sul microtomo. Così, lo stesso movimento del microtomo produce il movimento del nastro del porta sezioni. Questo movimento si regola mediante un piolino che fa ingranare al nottolino un certo numero di denti della ruota  $y$ . Se il nastro si muove molto lentamente le sezioni s'increspano, se troppo rapidamente si staccano: la pratica insegna presto a trovare la giusta misura.

Quando si cominciano ad avere le sezioni si dovrà usare un po' di diligenza per raccogliere il principio del nastro e posarlo sul nastro di cauciù.

Se il pezzo è lungo, dopo un certo tempo la vite micrometrica sarà esaurita e l'estremità destra della leva  $w$  avrà raggiunto il punto più alto. Allora si prende la testa della vite e la si gira a sinistra finchè l'estremità della leva sia riportata in basso, come lo era al principio del lavoro. Naturalmente l'oggetto viene così allontanato dal coltello, e sarà necessario riavvicinarlo, sia con l'allentare la vite  $R$  e spingere il cilindro verso sinistra, sia con l'allentare la vite  $K$ , e portando a sinistra tutto il portaoggetto. Fermate tutte le viti si può riprendere a tagliare. Ho già detto che quando occorresse fermarsi si spinge il manubrio  $k$  di contro alla caviglia  $a$  e lo si mette in posizione di arresto, infilando il piuoletto dritto nei due fori del pezzo ad incastro del manubrio, pezzo che va appunto ad abbracciare la caviglia  $a$ .

Dal genere di movimento del microtomo a bilico si capisce che le sezioni non sono piane, ma corrispondono a delle superficie di un cilindro: sono dunque curve. Ma essendo tutte curve uniformemente

e trattandosi di pezzi non grandi (5 mm. di distanza fra le due facce parallele), il difetto è trascurabile, anzi addirittura impossibile a rilevare. Se la superficie della sezione è rilevante allora l'inconveniente diventa notevole; ed ho già avvertito che il microtomo a bilico non si presta in questo caso. Ma per avere un lavoro esatto, quando si tratti di piccoli pezzi, questo microtomo è ottimo; oltre a ciò esso è semplice e solidissimo. Sarà bene (ma non è necessario) tenere unti gli assi e la vite micrometrica. Il prezzo del microtomo compreso il portasezioni, è di circa 250 lire.

**130. Microtomo a leva di J. G. de Groot, di Utrecht**, al quale si dovrà rivolgersi per l'acquisto <sup>1)</sup>. — Semplicissimo, solido, dà le sezioni piane, e permette con facilità di farne anche di grandissime, oltre 4 cm. di lato. Me ne sono servito e l'ho trovato veramente comodo per i soliti usi di laboratorio. Non lo si può dire uno strumento esatto, perchè non si ha la certezza che le sezioni riescano sempre dell'identico spessore; oltre a ciò l'orientamento del pezzo non si può fare così facilmente come nel microtomo a bilico. Probabilmente questi due difetti potranno, con opportune modifiche, esser tolti, come si potrà correggere l'altro inconveniente che le sezioni non si possono fare che dei seguenti spessori 2 1/2, 5, 7 1/2, 10, 12 1/2, 25  $\mu$ . Ma anche così com'è, non esito a raccomandare questo strumento per i vantaggi che presenta e per il poco prezzo (circa 200 lire). Consta di un robusto sostegno rettangolare con quattro gambe; all'interno dei due lati più lunghi del rettangolo si trova, da una parte e dall'altra, una piccola rotaia d'acciaio, e su queste è sospeso, con tre punti d'appoggio a gancio (due su una rotaia ed uno sull'altra), il carretto pesantissimo che porta inferiormente la vite micrometrica ed al disopra il portaoggetti. Questo è costituito da un piano di metallo, sul quale si attacca con la paraffina l'oggetto, e che al disotto porta, sorretta da un corto gambo, una sfera di metallo che penetra, può girare ed essere trattenuta dentro due mezze sfere cave; esse si chiudono mediante una vite.

Il portaoggetti è innalzato direttamente dalla vite micrometrica, ogni dente della quale corrisponde a 2 1/2  $\mu$ . A destra vi è un manico, fissato su di un asse vicino ad una gamba del sostegno; esso serve da fulcro ad una leva che, mediante due pezzi snodati, fa camminare avanti ed indietro il carretto e girare contemporaneamente (mediante un nottolino) la vite micrometrica della quantità voluta. Nella parte superiore del sostegno rettangolare si ferma, con delle viti, una piattaforma, nella quale sta immobile il coltello, che può essere un comune rasoio, come si scorge nella figura 24. Alla parte superiore e

<sup>1)</sup> Musco e laboratorio di zoologia dell'Università di Utrecht (Olanda).



posteriore della figura si trova il nastro portasezioni, che non si muove automaticamente, ma vien fatto girare dalla mano sinistra, mediante un piccolo pernio, che si vede a sinistra del nastro portasezioni. Quando il blocco è stato fissato sul portaoggetti, si dovrà ritagiarlo in modo che abbia due facce esattamente parallele al filo

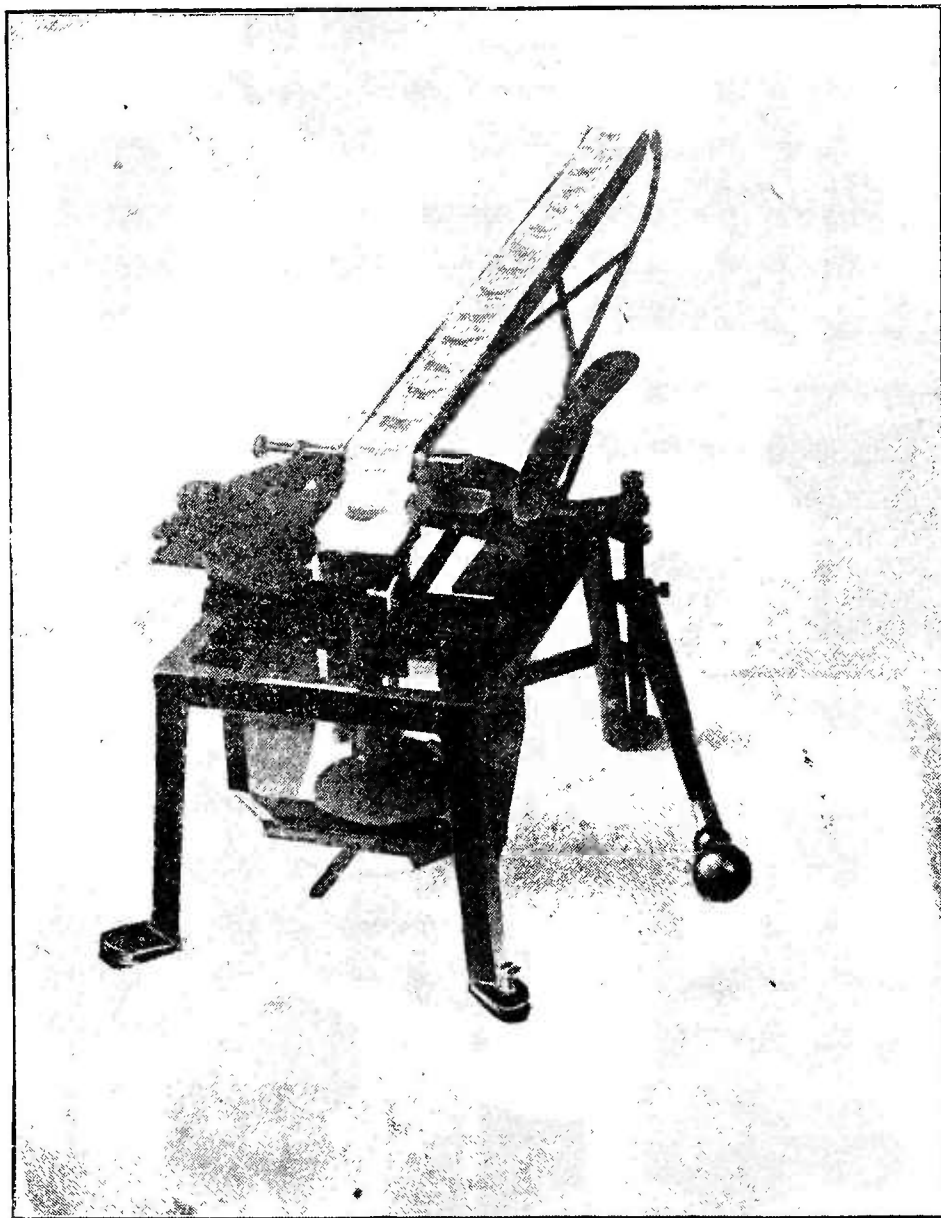


Fig. 24. — Microtomo a leva di J. G. DE GROOT.

del coltello: si rivestiranno poi le due superficie parallele con paraffina tenera surriscaldata fino a  $70^{\circ}$  C., perchè aderisca bene a quella dura del blocco. Poi si metterà il portaoggetti dentro alla cavità sferica e si stringerà la vite, cercando prima di orientarlo il meglio che si può. Siccome ciò non si può fare con quella facilità che si ha con la sospensione cardanica e col portaoggetti cilindrico,

bisognerà cercare di mettere il blocco sul piano del portaoggetti in modo che la superficie superiore corrisponda alla direzione del piano di sezione. La qual cosa non riuscirà difficile quando si tratta di oggetti vistosi, di una certa mole o già colorati *in toto*; ma sarebbe certo molto ardua con pezzi minuti o scolorati. Per questo il microtomo DE GROOT è più adatto per sezionare grossi oggetti. Il movimento vien fatto con la mano destra, che allontana ed avvicina il manico. Quando si muove il carretto in avanti, è necessario che compia tutta la corsa, altrimenti non si ottiene l'innalzamento del pezzo. Il movimento del braccio di leva si dovrà fare con moto uniforme e regolare, per non avere la compressione od anche la rottura delle sezioni. Per questo microtomo, come del resto per tutti quelli a tipo rapido, è sempre preferibile adoprare paraffina dura (58-60° C.), ed è più che mai necessario che la temperatura del laboratorio sia proporzionata a quella di fusione della paraffina, cioè da 20 a 23° C.

## CAPITOLO XI.

### Come si attaccano le sezioni e come si trattano successivamente.

**131. Generalità.** — Prima di tutto si deve chiedere: dove si attaccano le sezioni dei pezzi rivestiti con la paraffina? Sui portaoggetti, dicono tutti i trattati di tecnica. Ma io credo che in qualche caso sia molto più comodo attaccarle al coprioggetti, l'unico pericolo al quale si va incontro essendo quello di rompere il vetrino con le sezioni, se non si usa la delicatezza che è necessaria (e che del resto si acquista con un poco di pratica) nel maneggiare un oggetto così delicato. Ma di fronte a questo inconveniente vi sono dei vantaggi, come si vedrà da quanto esporrò in questo capitolo. Per le sezioni in celloidina sarà invece da preferire il portaoggetti.

Ciò premesso, è inutile insistere sul grandissimo vantaggio che si ha attaccando le sezioni, appena esse sono state tagliate col microtomo. Se questo non si facesse, tutte le operazioni successive (levare la paraffina, colorare, disidratare, rischiarare, ecc.), dovrebbero esser fatte mediante il continuo maneggio di sezioni delicatissime, che difficilmente resisterebbero e rimarrebbero intatte fino alla fine. Quando invece sono attaccate possono essere maneggiate e trasportate da un liquido all'altro con facilità e sicurezza.

Per le sezioni dei pezzi rivestiti con paraffina sono state consigliate parecchie sostanze che, distese sul vetro, servono da mastice. Ma alcune di esse meritano appena di essere ricordate, e non so per

quale ragione dovrebbero essere ancora adoperate, dal momento che ce ne sono di migliori. Così il metodo della lacca bianca (*shellac*) del GIESBRECHT, e l'altro del collodio e olio di garofano dello SCHAEFLIBAUM non hanno più che un valore storico. Metodi molto superiori e più semplici sono quelli dell'acqua distillata e dell'albumina glicerinata.

**132. Metodo dell'acqua distillata.** — Perchè questo metodo riesca è necessario che la superficie del vetro non sia unta, altrimenti l'acqua non si stenderebbe, e non farebbe aderire per capillarità la sezione al vetro. Ora, se si adoperano dei vetri nuovi, è facile trovarli non unti; se i vetri sono stati usati e poi puliti, molto probabilmente rimangono un poco ingrassati, e siccome i coprioggetti più facilmente si rompono e sono meno costosi dei portaoggetti, è assai più frequente che si adoperino coprioggetti nuovi, piuttosto che portaoggetti. Perciò si presenta più comodo attaccare le sezioni ai vetrini, invece che alle lastre. Ad ogni modo, siano queste o quelli, possono essere egualmente unti, e può darsi che non se ne abbia, per il momento, di nuovi. Per levare l'unto il meglio è di fregare la superficie del vetro con un pezzo di tela e del carbonato di calce sottilmente polverizzato: serve bene la così detta *calce di Vienna*. Questo metodo è di più sicura riuscita che non l'altro di lavare il vetro con sostanze solventi dei grassi. Spesso, nè gli acidi, nè gli alcali, nè l'alcool assoluto, o la benzina, o l'etere riescono a levare il grasso, sì che la goccia d'acqua possa distendersi e aderire al vetro. Invece, col calcare dopo pochi minuti di robusto sfregamento lo scopo è raggiunto. Occorre una piccola avvertenza nel fare l'operazione: se si tiene il vetrino<sup>1)</sup> fra le mani, nel rapido sfregamento esso può rompersi facilmente. Ciò si evita facendolo aderire ad una lastra di vetro e sfregando quindi la superficie libera; per quanta forza si faccia il vetrino non si romperà mai, perchè appoggia ugualmente con tutta la sua superficie su quella del vetro sottostante.

Quando il vetro non è unto, l'acqua lo bagna in modo uniforme, invece di rimanere a foggia di goccia, e forma un sottile strato piano. Su questa superficie si portano, con una pinzetta o con un pennello, un poco bagnato nell'acqua distillata, le sezioni, disponendole in ordine. Quando sono attaccate sulla lastra, le sezioni si dispongono da sinistra a destra; ma se sono attaccate così sul vetrino, è chiaro che si dovranno poi studiare, procedendo da destra a sinistra, perchè il vetrino dev'essere capovolto sulla lastra, quando si fa la chiusura del preparato. Bisognerà quindi attaccarle, sul vetrino, da destra a sinistra.

---

<sup>1)</sup> Per brevità chiamerò *lastre* i portaoggetti e *vetrini* i coprioggetti.

Le sezioni possono poi essere ordinate tanto in file orizzontali che verticali. In questo secondo caso è preferibile mettere la prima fila dall'alto al basso, la seconda dal basso all'alto, la terza come la prima, la quarta come la seconda, e così di seguito. Questa disposizione a zig-zag è molto comoda quando le sezioni devono essere studiate.

Quando le sezioni si attaccano al vetrino esse si dispongono facilmente in ordine, e tante se ne mettono quante ne comporta la superficie del vetrino stesso. Ma, quando si attaccano alla lastra, occorre che questa sia incassata in una tavoletta di legno, sul cui fondo sta un pezzetto di carta bianca, che porta segnato chiaramente a lapis un rettangolo, o un quadrato, o un cerchio, corrispondente alla superficie del vetrino col quale si desidera poi coprire le sezioni. È evidente che le sezioni saranno distese sulla lastra in modo da non esorbitare dai confini indicati dal sottostante tracciato a lapis.

Dopo che la superficie del vetrino, o quella corrispondente della lastra, sono coperte dalle sezioni, si aggiungerà col pennello una piccola goccia d'acqua, che, unendosi al sottilissimo strato di prima, farà leggermente galleggiare le sezioni. Ora, senza muovere il vetro per non spostare le fette, ci si avvicina con la bocca, e, tenendola socchiusa, si soffia con una certa forza il vapore umido e caldo; ciò facilita molto la perfetta distensione delle sezioni. Quindi si cercherà, col pennello umido, *ma non bagnato* (ciò si ottiene stringendolo, dopo bagnato, fra due dita o con le labbra), di levare l'acqua soverchia; infatti essa salirà per capillarità su per i peli del pennello. Allora le sezioni non si possono più muovere, e per farle aderire basterà che asciughino lentamente o alla temperatura del laboratorio (tenendole riparate dalla polvere ma allo scoperto), oppure mettendole dentro alla stufa riscaldata a 30-35, non più di tanto, gradi centigradi. Lasciandole asciugare senz'altro alla temperatura del locale occorreranno diverse ore, anche da un giorno all'altro; mentre nella stufa 2-3 ore sono sufficienti. Quando vetrino e sezioni sono asciutti, si può star certi che le une aderiscono fortemente all'altro, tanto che si può fare tutte le operazioni volute, passarle da un liquido all'altro, tenerle perfino sotto un filo d'acqua continuo per parecchio tempo, senza che si stacchino.

Se, invece che di sezioni isolate, si tratta di un nastro di sezioni continue, bisognerà tagliare prima con diligenza il nastro in tanti pezzi lunghi quanto è lungo il vetrino che si vuol adoprare, attaccando successivamente ed ordinatamente queste strisce, che si prendono ad una ad una leggermente con una fina pinzetta, oppure con la punta del pennello inumidita, in modo da metterle parallelamente una dopo l'altra. Del rimanente si procede come per le sezioni iso-

late. Una precauzione: quando il nastro è tagliato a pezzi, assicurarsi che nella stanza non può formarsi una corrente d'aria con l'aprirsi di un uscio, o in qualsiasi altro modo, perchè allora le strisce prenderanno facilmente il volo.

Per facilitare l'adesione dell'acqua al vetro è stato proposto di adoperare dell'acqua un poco alcoolizzata. L'APÀTHY invece allunga una parte di albumina glicerinata del MAYER (vedi sotto) con cento parti d'acqua. Altri usa stendere prima sul vetro un sottilissimo strato della suddetta albumina glicerinata e quindi ricoprirlo con una goccia d'acqua. Ognuno di questi espedienti può essere di giovamento in qualche singolo caso, ma nessuno è necessario, perchè, se il vetro non è unto, basta l'acqua distillata da sola. Inutile aggiungere che anche il pennello sarà ben pulito e diligentemente sgrassato. Ciò che si ottiene tenendolo per qualche ora in un tubetto con etere solforico e dopo qualche ora ancora con alcool assoluto.

Questo metodo dell'acqua distillata è semplice, sicuro ed ha il grande vantaggio che non interpone nessuna sostanza fra le sezioni e il vetro. Esso deve quindi essere preferito agli altri; la sua riuscita è infallibile purchè la *superficie del vetro non sia unta*, della qual cosa ci si assicura subito quando si bagna la superficie con acqua distillata. Se questa, dopo ch'è stata distesa, si rapprende in forma di goccia, vuol dire che il vetro è unto. Non lo è quando l'acqua si allarga uniformemente su tutta la superficie del vetro, e non si rapprende più, ma rimane distesa, formando un sottilissimo strato liquido.

**133. Albumina glicerinata del Mayer.** — Si prende un uovo di gallina freschissimo (e di questo bisogna esser sicuri), e si mescola una porzione dell'albumina con glicerina pura neutra a parti eguali, si aggiunge del salicilato di soda in ragione di 1 g. per cento di liquido; si sbatte a lungo, si lascia riposare e poi si filtra. Si conserva in una bottiglietta ben tappata.

Contrariamente a quel che si legge in alcuni trattati, assicuro che il liquido dura inalterato per molti anni; infatti ne ho ancora di quello preparato nel 1885, e la sola modificazione che ha subito è una leggera colorazione, ma serve bene come se fosse appena fatto.

L'albumina glicerinata si adopera quando si vogliono attaccare delle grosse sezioni e quando la superficie del vetro fosse più o meno unta. Si deve metterne uno strato sottilissimo, ed a questo scopo, dopo posta una gocciolina del liquido sul vetro, si adoprerà il dito, prima ben pulito, per distenderla. Quindi si asciuga due o tre volte il polpastrello su di un pezzo di tela molto netta, per tornare ogni volta a sfregarlo sulla superficie del vetro. In questo modo rimarrà un sottilissimo velo di albumina.

Per attaccare le sezioni, e non volendo comprimerle, sarà bene versare una goccia d'acqua sopra lo strato di albumina; le sezioni aderiranno più facilmente, ed anche si distenderanno completamente, se sono ripiegate. La lastra od il vetrino si metteranno nella stufa a 30-35° C., poi si porteranno a 55°-60° C.; così l'acqua e poi anche la glicerina se ne vanno, e le sezioni rimangono aderenti al vetro col sottilissimo strato di albumina interposto.

Se si fosse lasciata troppa albumina, questa renderebbe opaco il preparato. L'inconveniente può essere diminuito lavando con dell'alcool acidulato, nel caso che l'acido non sia di danno alla colorazione delle sezioni. Anche quando si attaccano con l'albumina glicerinata sezioni di pezzi colorati *in toto*, le quali non dovranno essere trattate che col solvente della paraffina e poi chinse, sarà bene fare una lavatura con l'alcool assoluto, poi tornare a rischiarare e chiudere. Così si è sicuri d'aver allontanato la glicerina, che potrebbe, col tempo, appannare la trasparenza del preparato chiuso nella resina.

Se le sezioni sono state colorate con una sostanza che contenga anche dell'acido picrico, non si dovrà attaccarle con l'albumina, perchè questa è sciolta da quell'acido.

**134. Per attaccare le sezioni in celloidina.** — Sono stati proposti molti metodi (SUMMER, WEIGERT, OBREGIA, ecc.), ma non servono che per sezioni molto grosse, cioè di 20  $\mu$  almeno, facili a maneggiarsi. Per le sezioni sottili, di 10  $\mu$  e meno, bisogna seguire le indicazioni di APÀTHY:

1.° Se il pezzo è stato colorato *in toto*, si taglierà tenendo bagnato continuamente il coltello e la superficie del blocco con alcool a 95 %. Appena tagliata, la sezione sarà raccolta con la spatolina di penna dell'APÀTHY (vedi capitolo XIX) e portata alla superficie dell'olio di bergamotto. Con la mano sinistra si terrà la lastra inclinata in modo che la parte destra più bassa rimanga immersa nell'olio; così la sezione, che si sarà distesa, verrà spinta con la spatolina dalla superficie dell'olio sulla lastra. Deposta la prima, si procede egualmente per le successive, in maniera da disporle in tante file parallele al lato più corto del rettangolo, procedendo da sinistra verso destra. Quando la superficie corrispondente alle dimensioni del coprioggetto è tutta occupata, si ritira la lastra dall'olio, lasciando che questo coli quanto più è possibile. Poi si asciugano le sezioni, comprimendole ripetutamente con della carta bibula satinata <sup>1)</sup>. Ciò fatto, si mette il balsamo e si copre col vetrino.

<sup>1)</sup> La carta bibula ordinaria è piegata una volta e poi satinata; questa operazione può essere fatta da qualunque legatore di libri. Dopo satinata si fa tagliare (lasciandola doppia) in tanti rettangoli delle dimensioni del portaoggetti.

2.° Se il pezzo non è colorato *in toto*, si tagliano le sezioni usando alcool a 70 % e si trasportano alla superficie di questa miscela: alcool assoluto 1, glicerina 1, acqua distillata 4. Si dispongono sul portaoggetti con le avvertenze date al n. 1. Si lascia colare il liquido e si asciugano le sezioni con la carta bibula satinata. Ciò si fa ripetutamente, prima con carta asciutta e poi con carta inumidita con alcool a 90 %, per levare tutta la glicerina. Bisogna avere l'avvertenza di deporre le sezioni una accanto all'altra, in modo che gli orli della celloidina si tocchino. La lastra è quindi messa dentro un tubo, come quelli delle figure 25 e 26, sul cui fondo si è versata qualche goccia di alcool assoluto ed etere solforico a parti eguali. La superficie con le sezioni sarà rivolta in modo da ricevere direttamente i vapori, quindi il tubo sarà chiuso. Dopo pochi minuti la celloidina si rammollisce formando uno strato continuo. Allora la lastra è tolta dal tubo e messa in un altro, pieno di alcool a 70 %. Qui la celloidina indurisce, e le sezioni rimangono attaccate fra di loro e al vetro. Possono essere colorate, passate nell'alcool a 90-95 %, quindi nell'alcool assoluto e cloroformio parti eguali, nel cloroformio solo e chiuse col balsamo.

3.° Se le sezioni devono essere trattate a lungo con soluzioni acide, sarà prudente ricorrere anche alla cornice di albumina, come è detto nel § 138.

**135. Per attaccare le sezioni tagliate in un mezzo acquoso.** — Si prende una soluzione 1 a 5000 di gelatina, alla quale è aggiunta una traccia di bicromato potassico al momento di servirsene, e si distende in piccola quantità sul vetro leggermente riscaldato. Vi si pongono sopra le sezioni, passando nella stufa a 30-35° C., perchè si distendano bene, e dopo pochi minuti si leva il vetro, si sgocciola il liquido e si lascia seccare all'aria per qualche ora <sup>1)</sup>.

**136. Trattamento delle sezioni attaccate.** — Se sono già colorate e fatte da pezzi imparaffinati, si dovrà semplicemente levare la paraffina, riscaldando il vetro *leggermente* e lavando con xilolo, cloroformio od altro solvente; dopo ciò non si avrà che da chiudere il preparato con le regole date nel capitolo XII. Se le sezioni sono da conservare in un mezzo acquoso, vedremo come si proceda per la chiusura del preparato. Se sono in celloidina, e non sono state attaccate al vetro, saranno portate nell'alcool a 95 %, non in quello assoluto, perchè scioglie la celloidina. Quindi si potrà rischiararle e chiuderle; ma per rischiararle non si adoprerà mai l'olio di garofano, che scioglie la celloidina, bensì l'olio di cedro, che rischiara molto lentamente, od anche quello di bergamotto, o, meglio di tutti, quando

<sup>1)</sup> HENNEGUY, *Leçons sur la cellule*, pag. 62, Paris 1896.

le sezioni non sono colorate coi colori di anilina, l'olio di origano. Poi si mette la resina e si chiude.

Se le sezioni sono da colorare, abbiamo ancora parecchie operazioni da compiere. Le sezioni fatte da pezzi rivestiti con la paraffina verranno prima leggermente riscaldate e lavate con xilolo, come sopra s'è detto, per levare la paraffina, quindi si passano nell'alcool assoluto, per levare il xilolo, poi nell'alcool a 70 % e nell'acqua distillata. Qui si lasciano per diversi minuti almeno, e poi si mettono

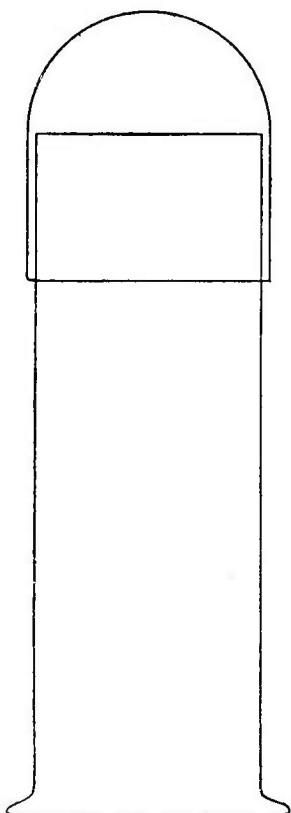


Fig. 25. — Tubo di vetro con coperchio a cappello.

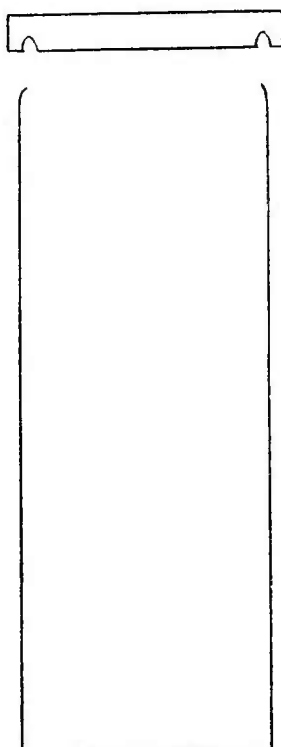


Fig. 26. — Tubo di vetro con coperchio a disco.

nella soluzione colorante; da questa si rimettono nell'acqua, se non c'è indicazione in contrario, poi nell'alcool; e quindi conviene, anzi in molti casi di colorazione con colori d'anilina è necessario, passare direttamente all'alcool assoluto, dopo avere sgocciolato ed aspirato con carta bibula, quanto meglio si poteva, l'acqua. Quando si è ben certi che le sezioni sono disidratate, si mettono nel rischiarante e poi si chiudono nella resina.

Se le sezioni sono attaccate alla lastra portaoggetti tutti questi passaggi si faranno immergendo il vetro dentro i liquidi contenuti in tubi di vetro, con un piede ed un coperchio. Un modello più economico di tubo è quello col coperchio a cappello (fig. 25); più costoso, ma che chiude molto meglio, è il coperchio piano a forma di



disco e provvisto di una incisura circolare arrotata che corrisponde esattamente all'orlo arrotato del tubo che penetra in essa. È importante, per i liquidi volatili come l'alcool assoluto, il xilolo, ecc., che i tubi chiudano bene. Ad ogni modo questi tubi hanno degli inconvenienti. Esigono (sia per la forma cilindrica del recipiente, che per la lunghezza della lastra) una quantità rilevante di reagenti, non solo di quelli di pochissimo valore, come l'acqua e la soluzione colorante, ma anche di quelli costosi, come l'alcool assoluto. Quindi si presenta più pratico l'uso di recipienti (d'altronde più costosi dei primi) foggiate a scatola rettangolare, corrispondente alle dimensioni del vetro che porta le sezioni. In queste scatole è sufficiente una quantità minore di reagenti, perchè basta che il vetro con le sezioni sia appena ricoperto dal liquido. La differenza non è lieve quando si pensa che, per esempio, l'alcool assoluto dev'essere cambiato volta per volta, perchè è ovvio che dopo aver disidratato un vetro non sarà più assoluto. E qui si scorge di quanto vantaggio sia per le sezioni da colorare di attaccarle al vetrino invece che alla lastra, per la minor quantità di liquidi che occorrono nel primo caso. Infatti i vetrini solitamente hanno un quarto della superficie della lastra; solo quando sono molto grandi, arrivano poco oltre la metà; serviranno quindi tubi e scatole di minori dimensioni. Anche la quantità dei liquidi occorrenti, per il pochissimo spessore del vetrino, rimane di molto diminuita.

Per le sezioni di pezzi rivestiti con la celloidina servono le stesse indicazioni. Bisogna provvedere prima ad attaccare le sezioni, come s'è detto nel § 134. Anche in tal caso è ovvio che le scatole rettangolari, nelle quali la lastra riposa in piano, si prestano molto meglio dei tubi verticali.

Per i piccoli oggetti (larve, blastodischi, membrane, ecc.), che si sono attaccati al vetrino o alla lastra, nel modo già indicato con la glicerina albuminata, valgono per tutte le operazioni successive le stesse indicazioni che ho date per le sezioni.

**137. Sezioni con cristalli di sublimato o di allume.** — Prima di chiudere il preparato nella resina, se si tratta di sezioni ancora sconosciute, sarà bene guardarlo al microscopio. Se la fissazione è stata fatta con sublimato può darsi che, per mancanza di accuratezza nei lavaggi con l'alcool jodo-jodurato, vi si scorgano dei cristalli di sublimato che deturpano la preparazione. Essi potranno essere tolti facilmente sulle sezioni di pezzi colorati *in toto* adoperando del xilolo nel quale si siano sciolti alcuni cristalli di jodo; vi si lascia il preparato per qualche minuto, si lava con xilolo puro e si chiude. Se la colorazione s'è fatta sulle sezioni i cristalli si leveranno ancor più facilmente lavando con alcool assoluto al quale si siano aggiunti dei cristalli di jodo.

Se l'impurità è dovuta all'allume contenuto nella sostanza adoperata per tingere le sezioni (carmallume o emallume), e che forma grossi ammassi subsferici cristallini di color giallastro, bisognerà riportare le sezioni, comunque siano, nell'acqua distillata ed ivi tenerle a lungo, facendo dei lavaggi prolungati. Perciò se le sezioni erano nel rischiarante bisognerà metterle nell'alcool assoluto, da questo nell'alcool debole e poi nell'acqua distillata. Se non si vuole che si sciolgano i colori d'anilina, che potrebbero essere già aggiunti all'emallume e al carmallume, bisognerà, dopo un rapido passaggio nell'alcool assoluto, mettere subito le sezioni nell'acqua distillata.

**138. Metodo Apáthy per tenere attaccate le sezioni delicate.** — Le sezioni, specialmente quelle molto sottili, di pezzi fissati con miscele osmiche non aderiscono così fortemente con l'acqua distillata, come quelle di pezzi fissati in sublimato. E, in generale, le sezioni sottili di oggetti molto friabili, e con tessuti eterogenei, come pure quelle che devono poi subire dei trattamenti prolungati con soluzioni acide od alcaline, talora si staccano parzialmente, o si gonfiano, o si raggrinzano, anche se sono bene attaccate con l'acqua.

In questi casi, non volendo o non potendo servirsi dell'albumina glicerinata, è meglio adottare l'ingegnoso espediente suggerito dall'APÁTHY. Sulla lastra portaoggetti si faccia un contorno corrispondente alle dimensioni del coprioggetti con la seguente miscela: albumina 1, acqua (con 0,5 % di formalina) 4, si aggiunga una traccia di fucsina. La lastra sarà riscaldata sulla fiamma o sul termostato a 70° C., per coagulare l'albumina.

Le sezioni sono deposte nell'interno di questa cornice d'albumina e, se sono tagliate da pezzi in celloidina, si dovrà disporle in modo che oltre ad essere tutte in contatto fra di loro, come ho detto al § 134, quelle periferiche si sovrappongano un poco alle strato di albumina. Poi si procede come ho indicato. Se le sezioni sono tagliate da pezzi in paraffina si attaccano con l'acqua nell'interno della cornice di albumina, e quando sono bene asciutte vengono ricoperte, con un pennello piuttosto largo e soffice, d'un leggerissimo strato di celloidina al 2 %, in modo ch'esso arrivi fin sopra l'albumina. Dopo un momento la celloidina è asciutta, e allora si può procedere a tutti i trattamenti necessari, con la certezza che le sezioni rimarranno perfettamente a posto. Bisognerà soltanto prolungare un poco i diversi passaggi nei liquidi, e si avrà l'avvertenza di non servirsi dell'alcool assoluto; ma di quello a 95 %; si passerà nel cloroformio ed alcool assoluto parti eguali, poi nel cloroformio puro, e quindi si chiude con la resina.

Il contorno di albumina può esser messo sulla lastra anche dopo aver attaccato le sezioni in paraffina, purchè esse siano perfettamente asciutte. In questo caso la temperatura di 70° C., necessaria per coagulare l'albumina, non danneggia i tessuti.

## CAPITOLO XII.

## Liquidi conservativi e così detti liquidi indifferenti.

## Vernici e resine.

**139. Generalità.** — Un tempo molto più usati, i liquidi conservativi e i così detti liquidi indifferenti, oggidi sono caduti quasi in disuso, perchè si preferisce fare l'osservazione su materiale bene fissato, indurito, disidratato, rischiarato e poi chiuso in modo permanente. Ma vi sono ancora parecchi casi nei quali si deve ricorrere a codesti liquidi. Non parlo dello studio di uova, larve o piccoli animali viventi che si sviluppano nell'acqua dolce, in quella di mare, o in un liquido del corpo dell'ospite (nel caso che si tratti di endoparassiti); perchè è ovvio che l'osservazione dovrà essere fatta nel liquido che costituisce l'ambiente solito dell'organismo. E se si dovrà prolungare per un tempo rilevante l'esame basterà aver cura di rinnovare il liquido, perchè esso sia bene ossigenato.

E qui c'è subito da notare che talvolta lo studio di piccoli esseri viventi è reso difficile dalla rapidità dei loro movimenti; in questo caso si dovranno aggiungere al liquido delle piccolissime quantità di una soluzione acquosa o anche leggermente alcoolica di una sostanza che produca l'anestesia, come, per esempio, il cloralio idrato, il cloridrato di cocaina, il semplice alcool, ecc. E se preme tenere ancora in vita, per altre ricerche, l'organismo si dovrà, appena finita l'osservazione, rimetterlo nel liquido normale, che verrà fatto circolare per un poco di tempo e con una certa rapidità finchè siano cessati gli effetti dell'anestesia, e l'animale, o larva che sia, abbia ripreso a muoversi come prima.

Ma non sempre è possibile o conveniente tenere in vita i piccoli esseri ed allora si ricorre per la conservazione a fresco a dei liquidi detti appunto liquidi conservativi; così pure si fa anche per singole cellule di un organismo, che sono state prima, con determinate manipolazioni (vedi capitolo XIII), dissociate. E perchè queste cellule siano mantenute col loro aspetto e dimensioni occorre servirsi dei così detti liquidi indifferenti, tali cioè da non permettere correnti osmotiche dal di fuori al di dentro, o dal di dentro al di fuori dell'organo, o dell'elemento. Ma ho detto sempre « così detti liquidi indifferenti » perchè invero, per gli elementi che vivono nell'interno di un organismo, dei propri e veri liquidi indifferenti, che possano essere tali per qualche tempo, *non esistono*. Infatti quando noi, per esempio, leviamo del sangue ad un vertebrato a sangue freddo

ed osserviamo gli elementi che lo compongono nel plasma stesso, o quando poniamo qualche cellula nell'umore acqueo, tolto dall'occhio dell'animale vivente, noi abbiamo solo per un brevissimo tempo un liquido che corrisponde a quello esistente nell'organismo. L'azione dell'ossigeno dell'aria, il cessare di quei complicati rapporti che esistono fra il liquido, finchè fa parte dell'organismo, e le pareti vasali, sono tante cause che agiscono rapidamente per turbare la costituzione di quel plasma o di quel liquido della camera oculare. Ne consegue una alterazione dei rapporti che intercedono fra le cellule in osservazione e il liquido che le contiene; da ciò un'azione modificatrice su tali elementi per opera del liquido, che non potrà più meritare il nome di *indifferente*.

Che si deve poi dire dell'ingenuità di quei pretesi istologi che prendono l'acqua distillata per liquido indifferente? Al contrario, essa è una sostanza che produce le più rapide e profonde modificazioni nell'interno della cellula: penetrandovi in quantità rilevante, gonfia gli elementi, che acquistano un aspetto turgido e vescicolare ben diverso da quello che hanno normalmente; nello stesso tempo forti correnti di diffusione portano all'esterno le sostanze solubili che si trovano all'interno del corpo cellulare.

**140. Liquidi così detti indifferenti.** — Uno dei migliori è l'acqua salata. La così detta soluzione fisiologica contiene 0,75 % di cloruro di sodio; ma si deve osservare che è una proporzione empirica ed inferiore al valore medio, vale molto meglio prepararsi volta per volta una soluzione che sia esattamente isotonica al sangue. Così per esempio per quello dei vertebrati terrestri la soluzione isotonica corrisponde a circa 0,9 % di cloruro di sodio <sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Per gli artropodi il BALLOWITZ, nello studio degli spermatozoi (vedi capitolo XXI), adoperava una soluzione 0.6 %, ma non so se si basasse su dati precisi od empirici. Per la conservazione a fresco si cerca sempre di adoperare una soluzione isotonica al liquido sanguigno dell'animale. Ora le ricerche di parecchi fisiologi hanno dimostrato che per tutti i vertebrati terrestri, ed anche per quelli marini a respirazione aerea, la soluzione salina isotonica al sangue (e quindi approssimativamente agli altri liquidi del corpo) oscilla fra 0.8 e 0.95 %.

Il metodo di ricerca è semplice. Conosciuto il punto di congelamento del sangue di un dato animale, si dovrà calcolare la concentrazione corrispondente di una soluzione di NaCl, sapendo che una soluzione 1 % di NaCl produce un abbassamento del punto di congelamento ( $\Delta$ ) = - 0.61° C.

Così il BOTTAZZI <sup>\*)</sup> trovò che per i pesci ossei marini la soluzione isotonica è di circa 2.21 %. Invece, per i plagiostomi e per gli invertebrati marini, appartenenti a gruppi diversi, trovò valori sensibilmente eguali fra di loro, con una media di 3.80 %, e che è, su per giù, la densità dell'acqua di mare.

---

<sup>\*)</sup> *Arch. ital. biol.*, 28. 1897, pag. 61. Vedi Anche BOTTAZZI, *Chimica fisiologica*, Milano 1898-99.

Il PICTET raccomanda una soluzione di cloruro di manganese, al 10 % per gli animali marini e, da 1 a 3 % (secondo il LEE) per quelli terrestri.

Quasi abbandonato è il siero jodato, che si prepara con del liquido amniotico di mammifero (al macello se ne potrà avere facilmente di pecora o di vacca), al quale si aggiunge dei cristalli di jodo; si agita di frequente per alcuni giorni. Il siero va tenuto in un recipiente largo, basso e sul fondo del quale vi devono essere sempre dei cristalli di jodo.

**141. Liquidi conservativi.** — Questi hanno lo scopo, non già di tenere vivente la larva, l'uovo o il piccolo animale da osservare, ma di conservarli inalterati nella forma, nelle dimensioni e di rendere più facile l'osservazione a fresco, rischiarandoli. Qui abbiamo fra i liquidi più utili, quelli a base di glicerina e contenenti acqua ed alcool.

Liquido del CALBERLA: glicerina 1, alcool a 90 % 1, acqua 1.

È certamente uno dei migliori liquidi conservativi; piccole uova anche in via di sviluppo, di anellidi e di altri invertebrati vengono bene conservati, e il vitello sensibilmente rischiarato, se sono tenuti per qualche giorno nel liquido.

Per oggetti più delicati il LEE raccomanda di mettere doppia quantità d'acqua.

Abbiamo poi i liquidi conservativi-fissativi; quelli cioè che mentre fissano realmente gli elementi possono conservarli anche per lungo tempo, senza bisogno di nessun cambiamento.

Molto noti a tutti sono i liquidi del PACINI, che ben a torto vennero lasciati in disparte nei recenti trattati, ma che sono di fatto utilissimi e superiori ad altri raccomandati come *eccellenti medium*. Il PACINI usava diversi liquidi, per adattarli specialmente al sangue dei differenti vertebrati <sup>1)</sup>.

1.<sup>o</sup> Sublimato 1, cloruro di sodio 2, acqua 200; questo specialmente per il sangue di pesci e di anfi, per lo sperma, le cellule epiteliali, i nervi, ecc. Buono anche per fissare cigliati e flagellati.

2.<sup>o</sup> Sublimato 1, cloruro di sodio 4, acqua 200; per il sangue di vertebrati superiori. Credo tuttavia che il primo liquido sia d'uso più generale.

Dal CARNOY sono molto raccomandati questi due liquidi:

---

<sup>1)</sup> Si conserva ancora nell'Istituto anatomico di Firenze qualche poco di materiale preparato dal PACINI. Io ho visto quest'anno (1898) dei globuli di sangue di rana conservati dal 1882 in una bottiglietta col liquido n. 1. Esaminati, mostrano ancora inalterata la forma; solo qualche nucleo ha la membrana un poco raggrinzata.

1.<sup>o</sup> *Liquido del Ripart et Petit*: Acqua di canfora 75, Acqua distillata 75, Acido acetico glaciale 1 g., acetato di rame 0,3 g., cloruro di rame 0,3 g.; si può aggiungere qualche goccia di soluzione osmica o di sublimato. Volendo anche tingere il tessuto con verde metile si può farlo perchè il colore non precipita.

2.<sup>o</sup> *Liquido del Gilson*: alcool a 60 % 60 cc., acqua distillata 30, glicerina 30, acido acetico (15 di glaciale in 85 d'acqua) 2, sublimato 0.15 g.

**142. Sostanze liquide per la chiusura permanente dei preparati.** — Talora piccoli organismi, larve, uova, porzioni di tessuti, ecc. non si possono disidratare, rischiarare e poi chiudere in una resina, ma devono essere conservati in un liquido. Si può in questo caso ricorrere ad uno dei liquidi conservativi or ora ricordati, deporre l'oggetto, con una goccia di liquido, nel centro del portaoggetti, mettervi sopra con riguardo il coprioggetti e *lutare* poi all'ingiro il vetrino sulla lastra in modo che non vi possa penetrare l'aria esterna e non esca il liquido che sta all'interno; nel qual caso si disseccherebbe l'oggetto.

Si avverta che se questo è molto delicato, in modo da essere danneggiato dal semplice peso del vetrino, bisognerà mettere due sottilissime strisce di carta ai fianchi dell'oggetto, in modo che il vetrino sia da quelle sorretto.

Più sotto dirò quali sono le sostanze che servono per lutare. Ora devo ricordare che il modo di conservazione permanente or ora descritto non è il preferibile; e che è molto meglio passare l'oggetto nella glicerina pura e chiuderlo dentro di questa o (meglio ancora) nel liquido del BRUN. Se poi non è necessario che l'oggetto rimanga nel liquido si potrà chiudere con grande vantaggio nella gelatina glicerinata, o nella gomma-sciroppo di APÀTHY, che si solidificano e si mescolano perfettamente con liquidi acquosi.

**143. Liquido del Brun**: acqua 140, glicerina 10, glucosio 40, spirito canforato 10. Si mescolano i tre primi, si aggiunge l'ultimo e poi si filtra per levare l'eccesso di canfora che sarà precipitata. Questo liquido è dichiarato dall'HENNEGUY molto superiore alla glicerina perchè conserva inalterati i colori di anilina.

**144. Gelatina e glicerina** <sup>1)</sup>: Una parte in peso di gelatina finissima francese è tenuta, per due ore, in 6 parti di acqua distillata, poi si aggiungono 7 parti di glicerina pura, e per ogni 100 g. della miscela si aggiunge 1 g. di acido fenico cristallizzato. Si riscalda per un quarto d'ora, così spariscono i fiocchi prodotti dall'acido, e si filtra a caldo ponendo in un imbuto del finissimo vetro filato. Al mo-

<sup>1)</sup> KAISER, in *Bot. Centr.*, 1880, pag. 25.

mento di servirsene se ne stacca un pezzetto, con la punta di un coltello, e lo si pone nel centro della lastra, si riscalda un poco alla fiamma ed appena liquefatta la miscela vi si depone l'oggetto tolto dalla glicerina; si copre delicatamente col vetrino, lasciando raffreddare. Solidificandosi nuovamente la gelatina, diventa inutile lutare il vetrino alla lastra; e del resto, questa essendo asciutta, la cosa si può fare con tutta facilità.

**145. Gomma sciropo di Apáthy.** — Si prende gomma arabica, scelta, in pezzi, zucchero di canna e acqua distillata 50 g. ognuna. Si scioglie a caldo e si aggiunge 0,05 g. di formalina.

Perchè rimanga quel volume di acqua occorre prenderne 100 g. e lasciarla a caldo ridurre alla metà.

Raccomando questo liquido ottimo. La gomma-sciropo si conserva inalterata e perfettamente trasparente per diversi anni: il vetrino è solidamente assicurato alla lastra e diventa anche inutile di lutare il vetrino, operazione tanto incomoda coi liquidi. L'indice di rifrazione della gomma-sciropo è circa 1,4.

Ma come conclusione di questo paragrafo consiglio di ricorrere alla conservazione nei liquidi quando ciò è assolutamente necessario; come quando per esempio interessa aver l'oggetto da osservare in una sostanza avente un indice di rifrazione inferiore a quello delle resine che si adoperano per la chiusura permanente. Se gli oggetti sono stati prima nei liquidi indifferenti o conservativi si potrà sempre passarli in un fissativo, poi nell'alcool assoluto, in una sostanza rischiarante, e da questa nella resina. Quando ciò non si potesse fare si chiuderanno nella gelatina-glicerina o nella gomma-sciropo di APÁTHY, che induriscono e seccano presto, come le resine. Indicherò altrove (capitolo XIV) il modo migliore per fare tutti questi passaggi senza sciupare gli oggetti.

**146. Vernici per lutare le preparazioni.** — Se l'oggetto deve essere conservato nella glicerina o nel liquido del BRUN bisogna, dopo coperto col vetrino, lutare questo con una vernice per attaccarlo alla lastra.

Si deve asciugare con diligenza la lastra intorno al vetrino, per levare il liquido soverchio che la bagna al di fuori dell'orlo del vetrino; ma questa operazione si faccia con la maggior precauzione, per non sottrarre il liquido contenuto al disotto del vetrino. Ciò fatto si riscalda una piccola quantità di gelatina glicerina e appena fusa la si depone con una spatolina o con un pennello tutto intorno al vetrino. Oppure si prende la gomma-sciropo. Si lascia raffreddare e quindi si ricopre tutto il contorno con la vernice.

Di queste ne abbiamo moltissime. Molto nota e vecchissima è quella fatta con una soluzione piuttosto densa di *Bitume di Giudea* o asfalto, nella trementina o, meglio, nella benzina. Buono è il

così detto *Cemento del Bell*, vernice inglese, di composizione sconosciuta, che può essere provvisto anche dal GRÜBLER. Molto lodato (io non lo conosco) è il *Cauciù del MILLER*, che si trova dagli ottici ed è, come il precedente, di composizione ignota. Può essere diluito con cloroformio ed alcool forte. Anche la ceralacca (si prenda quella di prima qualità) sciolta nell'alcool assoluto dà una vernice buonissima.

Di tante altre vernici non mi pare necessario intrattenermi. Gioverà meglio ricordare che talvolta può darsi che il liquido sotto il vetrino si alteri o dissecchi e che occorra levare la vernice, per aggiungere nuovo liquido. Si ricordi allora che il cemento del Bell e quello del Miller sono solubili nel cloroformio, il bitume di Giudea nel benzolo, xilolo, ecc.

**147. Resine.** — Quando l'oggetto è stato disidratato e rischiarato, può essere chiuso in una resina; le due adoperate comunemente sono: la resina *d'Ammar* (o Damar) e il *Balsamo del Canada*. Esse si sciolgono nella trementina, nella benzina, nel cloroformio, negli oli di garofano, cedro, ecc., nel benzolo, xilolo, ecc. Quale delle due resine sia da preferire, non saprei; chi dice che l'una è migliore dell'altra, probabilmente perchè dell'una ha avuto a disposizione una qualità migliore dell'altra; chi le adopera tutte e due insieme.

Il GOLGI nei suoi metodi assicura che la resina Dammar è migliore del balsamo, ma probabilmente ciò si deve al fatto, che quest'ultimo è sempre più acido della prima. Basterà dunque provvedersi di un balsamo poco acido (il GRÜBLER ora ne mette in commercio di quello neutro), perchè non si abbia differenza fra le resine.

Diversissime sono le indicazioni per i solventi dell'una e dell'altra. Chi assicura che non si ha una buona resina se non sciogliendola nella trementina, altri nel cloroformio, altri nel xilolo, altri nell'olio di legno di cedro. Parecchi invece giudicano necessario adoperare due solventi insieme. Ma come in tanti argomenti di tecnica, la scelta non ha alcun fondamento, all'infuori delle simpatie personali. Due caratteri ben diversi possiedono i solventi, e questi soltanto dovrebbero esser presi in considerazione: la differenza dell'indice di rifrazione e la differente volatilità. Una resina, sciolta nel cloroformio o nel benzolo, secca molto più presto di quella sciolta nel xilolo; e seccherà più lentamente nella trementina, più lentamente ancora nell'olio di cedro (se pur dissecca). Infine si dovrà assicurarsi che i solventi impiegati siano a reazione neutra.

Dalla tabella data nel § 114 si vede che il cloroformio ha un indice di rifrazione più basso della trementina, e questa più basso del benzolo e del xilolo, i quali sono inferiori all'olio di legno di cedro, e questo all'olio di garofano, il cui indice (1.533) si avvicina moltissimo a quello del balsamo del Canada (1.535).



In generale serve bene come solvente il xilolo, che è sempre neutro, e non abbassa di molto l'indice di rifrazione del balsamo. Questo dissecca abbastanza rapidamente, non così presto come farebbe col cloroformio o col benzolo e non troppo lentamente, come farebbe con la trementina o, peggio ancora, con gli altri oli. In qualche caso speciale occorre di tenere alto quanto più è possibile l'indice di rifrazione della resina, ed allora si ricorrerà anche all'olio di legno di cedro, lutando e inverniciando poi l'orlo del vetrino, perchè rimanga saldamente attaccato alla lastra; ciò che è importante quando si adopera l'obiettivo ad immersione.

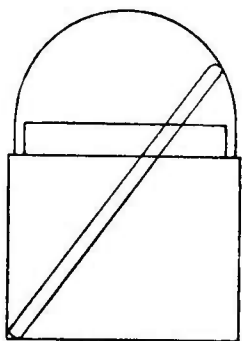


Fig. 27. — Vasetto per la resina, visto in sezione.

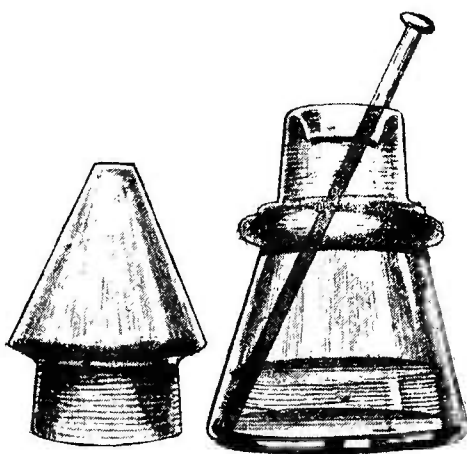


Fig. 28. — Vasetto per la resina, secondo il modello di FOL

È necessario provvedersi di resine di qualità ottima; talvolta, in commercio, se ne vendono di pessime. Quella Dammar si ha più difficilmente trasparente; occorre fare la soluzione molto allungata, filtrare con un imbuto tenuto riscaldato, poi concentrare al punto voluto, facendo evaporare a bagno-maria.

Quando si versa dal recipiente di deposito la resina, per metterla sulla bottiglietta *ad hoc*, che si tiene sul tavolo, non si deve rimettere poi subito il tappo o coperchio sul recipiente, perchè la resina che si trova vicino all'orlo farà da mastice ed attaccherà saldamente il tappo alla parete del vaso. Bisogna, prima di chiudere, pulire accuratamente con un pezzo di carta bibula, inumidita nel solvente della resina, l'orlo del vaso.

Per tenere la resina sul tavolo da lavoro si adoprerà uno dei due vasetti speciali, dei quali è data la figura (27 e 28), e nell'interno vi si lascerà una bacchetta di vetro, per prendere la resina.

È stato proposto anche di usare il balsamo sciolto nell'alcool assoluto; ma non occorre dire che si ha così un *medium* avente un indice di rifrazione molto basso, e che quindi non è da consigliare in

generale. Il LEE loda questa soluzione, dicendola migliore di tutte per la buona conservazione dei preparati (egli rischiarava con xilolo prima di chiudere nel balsamo-alcool). Del resto non la consiglia che per materiale colorato col carminio; non serve coi colori dell'ematossilina, tanto meno con quelli di anilina.

**148. Colofonio in trementina.** — Molto raccomandato dal LEE. Nella trementina calda a 40-50° C. si pongono piccoli pezzi di colofonia purissima, della più chiara e della migliore; quando è sciolta, si filtra a caldo per due volte, e si lascia condensare al punto desiderato, tenendo presente che, col tempo, l'ispessimento aumenta spontaneamente.

**149. Trementina veneziana in alcool assoluto.** — Questa trementina (ottenuta dal *Pinus larix*) si mescola con un uguale volume di alcool assoluto neutro (si tenga l'alcool assoluto del commercio con del solfato di rame e del calcare calcinati, poi si filtri). Si mescola spesso e si tiene per 1-2 giorni nella stufa, finchè raggiunge lo spessore voluto.

Da non adoperarsi con oggetti tinti coi colori dell'ematossilina o di anilina; molto comoda in taluni casi, perchè si mescola con tracce di glicerina o di acqua senza intorbidarsi. Il suo basso indice di rifrazione la rende utilissima per lo studio di alcuni dettagli delicati; i preparati si conservano inalterati anche dopo quindici anni (VOSSELER).

**150. Chiusura dei preparati.** — Per chiudere il preparato, dopo messe a posto le sezioni, se queste sono attaccate al vetrino, si prenderà una lastra pulita, ci si passerà sopra un pannolino ben pulito per assicurarsi che è tersa, si riscalderà un momento sulla fiamma e si deporrà sul tavolo; quindi, nel centro di essa, si verserà con la bacchetta una goccia di resina, e vi si capovolgerà il vetrino, che sarà stato tolto dal rischiarante e del quale la faccia che non porta le sezioni sarà stata rapidamente asciugata con un pezzo di tela; si accomoderà con un ago il vetrino, in modo ch'esso rimanga simmetricamente disposto nel centro della lastra, e si terrà questa in posizione orizzontale, possibilmente riparata dalla polvere, finchè asciuga la resina. Se le sezioni sono state attaccate alla lastra, allora si verserà la goccia di resina sul vetrino, che prima si riscalderà leggermente, dopo averlo ben pulito, e lo si deporrà rovesciato sul preparato. Nel far questo, se, invece di sezioni attaccate, si tratta di piccoli oggetti isolati, può darsi che, quando il vetrino tocca la resina, essi vengano spostati e trasportati da una parte; per impedirlo, bisogna reggere il vetrino con un ago, in maniera che appoggi con lentezza. Se si trattasse di oggetti molto mobili e che non devono essere minimamente spostati da quella data posizione, è meglio di non mettere il vetrino, ma la resina sola, e di aspettare qualche

tempo prima di coprire, perchè la resina si condensi e si rapprenda un pochino.

Nel coprire il preparato avviene quasi sempre che vi rimangano delle bolle d'aria; se queste sono piccole, non occorre occuparsene: col disseccare della resina spariscono; se sono grandi, basterà comprimere, con un certo riguardo, il vetrino, perchè siano portate sull'orlo e se ne vadano.

Se, avendo un vetrino grande, si è ecceduto nella quantità di resina, in modo che questa strabocchi lateralmente dagli orli, non si dovrà levarla finchè è fresca, a meno di farlo con molto riguardo; perchè, sfregando contro gli orli del vetrino, è facile danneggiare il preparato; meglio lasciar stare, e solo dopo qualche giorno, quando la resina è ben secca, si leverà quella soverchia con un coltello.

Appunto per la facilità che hanno le resine di disseccarsi, in modo che vengono a costituire un tutto col vetrino e con la lastra, diventa inutile lutare o verniciare in un modo qualunque l'orlo del vetrino. Fa eccezione il caso rammentato nel paragrafo precedente, che il solvente della resina sia l'olio di cedro o altro analogo, che dissecca con molta difficoltà.

**151. Come si staccano i vetrii già attaccati.** — Se il coprioggetti è chiuso da breve tempo, basta inumidirne gli orli col solvente della resina e poi, sollevando leggermente e senza sforzare un lato di esso, far penetrare dell'altro solvente, e così procedere finchè tutto il vetrino sia staccato. Ma, se la resina è disseccata da lungo tempo, occorre mettere tutto il preparato in un recipiente che contenga tanto solvente della resina da ricoprirlo tutto e poi si tiene il recipiente dentro la stufa a 30-35° C. Dopo qualche ora il solvente ed il calore avranno rammollito la resina, e il vetrino potrà staccarsi dalla lastra.

### CAPITOLO XIII.

## Corrosione, decalcificazione, desilicificazione, imbianchimento.

**152. Corrosione.** — Sarebbe importante di poter trovare una sostanza che corrodessa e rammollisse la chitina, per potere fare facilmente sezioni di animali, che, come gli artropodi, presentano delle grandi difficoltà appunto per la presenza di quella sostanza. Ma i liquidi proposti, acqua di JAVELLE (soluzione d'ipoclorito di potassio) ed acqua del LABARRAQUE (ipoclorito di sodio), non sono da consigliarsi; essi rammolliscono bensì e corrodono la chitina, ma alterano anche i tessuti, per quanto essi siano stati precedentemente fissati.

**153. Decalcificazione.** — Lo stesso sublimato, l'acido cromico, quello picrico, adoperati nella fissazione, cominciano a dissolvere i sali di calce. Più energici sono l'acido cloridrico o il nitrico. Quest'ultimo è specialmente raccomandato per la decalcificazione delle ossa, al 10 % se si tratta di ossa di adulto, all'1 % se le ossa sono molto giovani. Appena ottenuta la decalcificazione, si lava per 1-2 ore in acqua corrente, e si pone in alcool a 95 %, che sarà cambiato dopo pochi giorni.

Meglio ancora, per lo stesso scopo, fare una soluzione 3 % di acido nitrico nell'alcool 70 %. Il MAYER usa una soluzione di acido nitrico al 5 % nell'alcool a 90 %.

**154. Metodo Rousseau**<sup>1)</sup>. — I pezzi, anche grossi due centimetri (interi echini, molluschi, corallari, spugne), sono fissati ed induriti, poi rivestiti accuratamente in celloidina, e dopo messi in alcool 85 %, acidificato con 15-40 parti % d'acido nitrico ( $D = 1.4$ ). Dopo si lava in alcool e si taglia. Ho visto delle belle sezioni, ottenute dall'autore, di spugne e di *Echinus microtuberculatus* interi. Certo che, per lo studio morfologico, il metodo è molto buono; non oserei dire altrettanto per le ricerche di fina istologia. Ad ogni modo, sarà importante fissare prima bene e indurire con diligenza il tessuto; incelloidinarlo pure diligentemente e poi trattarlo con l'acido nell'alcool, servendosi, per quanto è possibile, delle soluzioni meno forti (15-20 %). Ottenuta la decalcificazione, sarà bene, quando sia possibile, con un taglio netto, fare due o tre parti dell'oggetto, rimmetterlo nell'alcool assoluto, poi alcool ed etere, e tenerlo nella celloidina allungata, quindi in quella più densa.

Questo secondo incelloidinamento ha lo scopo di riempire i vuoti lasciati dal carbonato di calce, che per alcuni animali (echinodermi, molluschi) possono essere rilevanti e che, se lasciati, potrebbero essere d'impaccio quando si fanno le sezioni.

Per le spugne, il metodo del ROUSSEAU ha questo grande vantaggio, che la forma delle spicule rimane perfettamente visibile, benchè il carbonato di calce sia stato distrutto; ciò si deve al diverso potere di rifrazione della glicerina o del balsamo, che vanno ad occupare il posto occupato dalle spicule, e della celloidina che imbeve tutto il rimanente del tessuto.

**155. Floroglucina acida.** — Una parte di floroglucina si scioglie in 10 di acido nitrico puro ( $D = 1.4$ ) riscaldando lentamente e con precauzione, poi essa si versa in 50 cc. d'acqua distillata. Occorrendo, si può allungare con acqua acida (100 cc. di acqua, 20 g. di acido nitrico). In mezz'ora si decalcificano così le ossa di un neonato; in poche ore

<sup>1)</sup> *Zeit. wiss. Mikr.*, 14. 1897, p. 205.

piccoli pezzi d'ossa d'adulto. Si lava a lungo, per due giorni, nell'acqua corrente. L'acido nitrico può essere sostituito da quello cloridrico al 30 %. Il FERRERI scioglie a caldo 1 g. di floroglucina in 100 d'acqua con 10 di acido cloridrico, e, quando è freddo, aggiunge al liquido 200 cc. di alcool a 70 %.

**156. Desilicificazione.** — Questa è necessaria per le spugne silicee. Vale lo stesso metodo del ROUSSEAU. Invece che con acido nitrico, si dovrà acidulare l'alcool con acido fluoridrico. Si usi molta precauzione nel servirsene! L'acido fluoridrico non dev'essere toccato nè con oggetti metallici, nè di vetro, ma soltanto di cauciù indurito (ebanite); va tenuto in recipienti della stessa materia; oppure anche di vetro, purchè si siano rivestiti internamente con uno strato di paraffina. A 50 cc. di alcool si aggiungono 20-30 gocce di acido fluoridrico, e vi si mette il pezzo incelloidinato, non più grosso di 1 cm., per 1-2 giorni. Si lava ripetutamente con alcool puro.

Il LEE non crede necessario levare la silice, e assicura che si possono tagliare le spugne silicee bene rivestite senza difficoltà. Certamente i coltelli non ci guadagneranno.

**157. Imbianchimento.** — Il MAYER pone in una provetta, con alcool a 80 %, qualche cristallo di clorato potassico, aggiunge poche gocce di acido cloridrico, che si fa arrivare a contatto dei cristalli di clorato, portandovelo con una pipetta. L'oggetto si pone nell'alcool, e con lo sviluppo del cloro nascente esso si decolora in un'ora o anche un giorno, a seconda dello spessore. Con lo stesso metodo si possono imbiancare le sezioni attaccate al vetrino.

Il MAYER assicura che questo metodo è superiore a quelli del POUCHET e del CARAZZI, basati sull'uso dell'ossigeno libero.

## CAPITOLO XIV

### Preparazioni ed osservazioni diverse.

**158. Plankton.** — Con questo nome si comprende l'insieme degli organismi che vivono pelagici nell'acqua, sia dolce che di mare. Ma io qui intendo trattare soltanto di quelli che non possono essere osservati ad occhio nudo per la loro piccolezza. Oltre a molti vegetali inferiori, vi sono in grande quantità protozoi, piccoli metazoi, larve, uova. Non è mio compito dire come si raccolgono, ma solo come si osservano e si preparano.

Può darsi che vengano raccolti in grande quantità in piccolo volume d'acqua, oppure in quantità relativamente scarsa in molta acqua. In questo secondo caso bisognerà mettersi davanti agli occhi il recipiente di vetro abbastanza sollevato da poterlo osservare at-

traverso alla luce della finestra, pur tenendolo appoggiato, per avere le due mani libere. Ciò si fa bene collocando il vaso contenente l'acqua col plankton sopra un dado di legno messo sul tavolo; in questo modo, stando seduti, si avrà il recipiente all'altezza degli occhi e bene illuminato. Si osservi attentamente, e con un poco di pratica si riuscirà a scorgere parecchi corpiccioli che si muovono. Può darsi che la maggior parte del plankton si sia raccolta sul fondo del vaso e allora converrà, con una bacchetta di vetro forata e aperta ai due estremi, smuovere il liquido del fondo, perchè il deposito si sollevi, e possa così esser diligentemente osservato. Quando in sospensione nel liquido si scorge quel che si ricerca, o qualcosa che si suppone che possa specialmente interessare, si tratta di prenderlo per portarlo in un piccolo recipiente. Ciò si fa con un poco di destrezza servendosi della bacchetta di vetro. Questa si afferra ad un estremo, tenendola fra le dita pollice e medio, mentre si appoggia e si comprime con forza l'indice contro l'apertura del tubo; si regge il tubo verticalmente e lo si porta con la parte opposta dentro al vaso fino a che si riesce a porlo con l'apertura inferiore immediatamente al disopra dell'oggetto desiderato. Allora si solleva adagio l'indice, in modo che, potendo l'aria uscire dalla parte superiore, possa anche penetrare da quella opposta l'acqua, e con essa l'oggetto. Appena si è certi che questo è penetrato nel tubo di vetro, si tornerà a chiudere ermeticamente con l'indice l'apertura superiore e si estrarrà il tubo dal vaso, alzando il braccio. In questo modo il liquido ch'era penetrato dentro il tubo vi resterà fin quando sia messo in un piccolo recipiente di vetro (una saliera, un portaoggetti incavato, un vetro da orologio, una scatola di cristallo, una vaschetta, ecc.); ciò che si fa tornando ad alzare l'indice, perchè il liquido con l'oggetto cada dentro il piccolo recipiente. Si potrà ora esaminare con la lente, col microscopio da dissezione, o con quello composto, e cominciare l'osservazione sul vivo. Se poi interessa addormentare il piccolo organismo od ucciderlo e fissarlo immediatamente, si verserà il liquido occorrente (alcool, acido osmico, soluzione di cloralio idrato, sublimato, o qualunque altra sostanza) nell'acqua stessa che contiene l'animale. Se si vorrà, prima di tutto, disegnarlo, converrà non ucciderlo, ma lasciarlo vivente ed immobilizzarlo, ciò che si fa sollecitamente con qualche goccia di una soluzione di cloralio, o di cocaina od anche semplicemente con alcool. L'operazione dev'esser condotta cautamente, versando il liquido a goccia a goccia e servendosi di soluzioni molto allungate; perchè se l'anestetico è troppo energico o in troppa quantità, il piccolo essere delicato può scindersi con delle contrazioni violente, deformandosi tutto e rompendosi magari in diversi pezzi.

Se l'organismo, dopo disegnato, dev'essere conservato in vita, :

dovrà rimetterlo nel liquido in cui vive, togliendolo dall'anestetico; ciò si può fare senza muoverlo, sostituendo con una pipetta un liquido all'altro; oppure si potrà prenderlo subito e trasportarlo nel liquido fresco. Per fare questo senza toccarlo, ci si serve di un contagocce che abbia un'apertura piuttosto larga e poco affilata; con una leggera aspirazione l'organismo penetrerà col liquido dentro al contagocce e sarà così trasportato nel secondo liquido.

Se invece conviene di più conservare il materiale, per farne un preparato microscopico, si potrà ucciderlo, fissarlo, colorarlo, ecc., sia sostituendo con dei contagocce i diversi liquidi nello stesso recipiente, sia trasportandolo, col metodo sopra indicato, in differenti recipienti che contengono i liquidi necessari.

Comodissima è anche l'ansa di platino figurata da APÀTHY <sup>1)</sup>. Uno dei sottili fili di platino, saldato ad una bacchetta di vetro (come quelli usati dai batteriologi), è ripiegato all'estremità libera a forma di piccolo cerchio del diametro di 2 mm. Il cerchio è poi piegato da un lato, in modo da fargli fare un angolo retto col filo. Questo semplice utensile serve bene quando si deve levare un oggetto molto piccolo da una soluzione, e che si vuol evitare di trasportare insieme anche il liquido. Infatti, di quest'ultimo ne rimane appena una traccia, cioè quello necessario per formare il diaframma sottilissimo, che rimane per adesione sul cerchio di platino.

Messo sulla lastra, dopo disidratato e rischiarato, l'oggetto s'immerge in una goccia di resina, e si depone con diligenza il vetrino al disopra; se è molto delicato s'interporranno fra la lastra e il vetrino due piccole strisce di carta. Del resto, per la chiusura dei preparati, vedi § 150.

Può darsi che il plankton sia costituito da organismi così piccoli che non possono essere osservati nel modo indicato, ma devono venir messi subito sulla lastra e ricoperti col vetrino, per poterli esaminare con forti obiettivi. Allora, dopo presi con la goccia d'acqua, vengono provvisoriamente studiati in questo modo, avvertendo che, se si desidera vederli anche in movimento, sarà opportuno che la goccia sia piuttosto grossa, o sarà anche necessario sostenere il vetrino con due strisce di carta. Se poi fa comodo averli immobilizzati, si appoggerà senz'altro il vetrino alla lastra e si sottrarrà, aspirandola con carta bibula, porzione dell'acqua sottostante. Se ora si vuol fare il preparato definitivo, bisognerà che sotto al vetrino stesso vengano fatti passare i diversi liquidi fissativi, coloranti, ecc.; e ciò non è difficile quando si abbia cura di deporre una goccia di reagente da un lato della preparazione, a contatto con l'orlo del vetrino,

---

<sup>1)</sup> *Mikrotechn.*, pag. 225, fig. 4, B.

e si faccia aspirazione con una striscia rettangolare di carta da filtro, dal lato opposto. Inutile dire che i diversi reagenti dovranno essere molto allungati, per non produrre contrazioni e deformazioni negli oggetti da preparare.

Questo metodo presenta ad ogni modo un inconveniente notevole: nel fare queste correnti liquide succede spesso che gli oggetti sono trascinati tutti verso l'orlo dal quale si fa l'aspirazione; ed occorre molta pazienza e diligenza per mantenerli sotto il vetrino. In questo caso, se il materiale di cui si dispone è abbondante, sarà molto meglio trascurare quel poco che si ha sotto il vetrino, e mettere in un calice di vetro una certa quantità di liquido contenente altri organismi; si versa nel liquido qualche goccia di soluzione osmica, o, meglio, un poco di soluzione di sublimato. Così gli organismi cadono al fondo, uccisi e fissati; si possono allora raccogliere, o con



Fig. 29. — Sezione di una piccola saliera di vetro.

la decantazione del liquido soprastante o aspirandoli con un contagocce, e trattarli con i diversi reagenti per farne dei preparati permanenti.

Fra i recipienti più adatti per questi passaggi consiglio quelle piccole saliere a base quadrata, che hanno una cavità emisferica, e delle quali sarà bene averne un certo numero, alcune bianche ed altre nere. Si coprono facilmente con un pezzetto di lastra quadrata.

Un metodo molto utile per preparare piccoli oggetti è quello indicato dall'ARNOLD per l'esame del sangue (capitolo XXIII).

Se il plankton è già raccolto in quantità rilevante in un piccolo volume d'acqua, sarà più facile, prendendo una goccia del liquido, trovare gli organismi da studiare e da preparare. Volendo conservare rapidamente il rimanente, lo si ucciderà e fisserà col sublimato acquoso, poi si decanterà e si verserà dell'alcool jodo-jodurato, e questo si cambierà finchè non si scolora più. Si conserva così fissato il materiale nell'alcool a 80 %. Se il plankton è di mare, il sublimato formerà abbondanti cristalli, che si leveranno facilmente, dopo fatti i passaggi nell'alcool, decantando e lavando con acqua distillata cambiata un paio di volte. Si lascia depositare, si decanta e si torna a versare alcool, nel quale rimane definitivamente conservato il materiale.

Quando si deve prolungare per molte ore l'osservazione sotto al microscopio di qualche piccolo organismo vivente in una goccia



d'acqua, bisognerà impedire l'evaporazione del liquido. Ciò che si ottiene servendosi della camera umida. Semplice ed economica è quella dello STRICKER, ricordata dall'APÀTHY. Sul centro del portaoggetti si forma un piccolo anello con dell'olio di ricino denso ed inodoro. Nello spazio interno si depone la goccia d'acqua, quindi si copre col vetrino, che aderisce all'olio, e si chiude ermeticamente.

**159. Esame a fresco di cellule e di tessuti viventi.** — Come ho indicato per il plankton, si potrà fare anche l'osservazione di protozoi, sia liberi che parassiti, portandoli nell'acqua o nel liquido in cui vivono; lo stesso vale per le uova o le larve, e in questo modo si potranno anche esaminare gli elementi del sangue dei vertebrati inferiori, purchè si provveda ad impedire l'evaporazione del plasma, oppure si aggiunga qualche goccia di soluzione fisiologica di cloruro di sodio. E in questo modo si potrà osservare, per un tempo brevissimo, anche il sangue degli uccelli e mammiferi, purchè si abbia avuto la precauzione di riscaldare la lastra rispettivamente a 40 e 37° C., e non la si metta a contatto col tavolino del microscopio, ma la si isoli con un pezzo di legno interposto. Ad ogni modo tanto le emazie che i leucociti si altereranno rapidamente (vedi capitolo XXIII, preparazione del sangue).

Volendo prolungare l'osservazione ad una temperatura elevata, bisognerà provvedersi del tavolino riscaldabile del LÖWIT (§ 189).

In un così detto liquido indifferente, la soluzione fisiologica o un liquido dell'animale (umor acqueo dell'occhio, plasma delle cavità del corpo) si potranno esaminare viventi diversi elementi staccati da un organo; per es., cellule dell'epitelio boccale dell'uomo, che si staccano grattando la mucosa con una spatola di metallo o con un'unghia; cellule cigliate della faringe della rana, che si ottengono spaccando con delle forbici robuste l'articolazione della mandibola ai due lati, poi sollevando bene la testa e tagliando con una forbice un piccolo brano di faringe.

Nell'umore stesso del corpo dell'animale si potranno osservare elementi dei tessuti di molti invertebrati, molluschi, artropodi, ecc.

Nelle larve di anfibì si potrà osservare la circolazione del sangue, e così pure nella membrana mesenterica della rana (vedi cap. XXIII). Anche piccole membrane, fibre isolate di nervi o di muscoli, cartilagini tagliate in fette sottili con un rasoio e messe in liquidi indifferenti, potranno servire per l'esame a fresco.

**160. Dissociazione.** — Questa operazione consiste nel separare con degli aghi, o anche col dorso di un bisturi o con un pennello ruvido, alcuni elementi, per isolarli dal tessuto di cui sono parte, e metterli in un liquido indifferente per esaminarli al microscopio. Talvolta, se si tratta di un tessuto molto compatto, si potranno avere

i singoli elementi sbattendone un pezzo dentro un tubo con della soluzione fisiologica.

**161. Macerazione.** — Per poter isolare gli elementi, occorre talora ricorrere a questa operazione, che consiste nel lasciare per qualche giorno il pezzo di tessuto in un liquido che a poco a poco rammollisce la sostanza intercellulare e permette quindi la successiva separazione delle cellule. Qualche volta la macerazione si fa spontaneamente lasciando il pezzo di tessuto, tolto all'animale appena ucciso, in un cristallizzatore coperto con un disco smerigliato, che si unge sull'orlo, in modo da avere una chiusura ermetica. Vaso e coperchio saranno prima sterilizzati, oppure si lascerà all'interno, insieme col tessuto, anche alcuni cristalli di acido fenico. Dopo 24 ore si può, col semplice raschiamento, avere degli elementi isolati.

La macerazione nei liquidi è facilitata da una temperatura piuttosto elevata, e quindi, specialmente all'inverno, sarà opportuno servirsi del termostato a 35-40° C. Di solito si usano delle soluzioni molto allungate (1 per 2000) di acido cromico, o dei suoi sali, o di acido osmico. Questi liquidi devono agire per diversi giorni (8-15) alla temperatura ordinaria. Un liquido molto adoperato è il così detto alcool al terzo del RANVIER, che si fa aggiungendo due volumi d'acqua ad un volume di alcool del commercio (a 90 % circa). Una soluzione al 10 % di cloruro di sodio (ENGELMANN, BALLOWITZ ed altri si servivano di soluzioni più leggere, da 0,6 a 3 %) e delle forti soluzioni di potassa caustica (fino al 40 %) sono pure liquidi maceratori. In generale essi devono agire per alcune ore, o anche per 24 e più. La soluzione di potassa caustica più debole, 8-10 %, serve bene per lo studio dei tessuti cheratinizzati: epidermide, unghie, peli. ecc.; dopo qualche ora le cellule turgide si separano facilmente. Per sciogliere la sostanza intercellulare del tessuto muscolare è stato consigliato l'acido nitrico al 20 %; dopo 24 ore d'immersione si sbatte fortemente il tessuto posto in un tubo di vetro con acqua; per conservare le cellule isolate si può adoperare una soluzione d'allume al 5 %, alla quale si aggiunge un po' di acido salicilico o di salicilato di sodio.

Un buon liquido macerante per molti invertebrati è quello proposto dall'APÀTHY <sup>1)</sup> per gli Irudinei: 3 vol. di acido acetico glac., 3 di acido nitrico concentrato, 20 di glicerina, 20 d'acqua distillata e 20 di alcool assoluto. Si macera per 24 ore e si trasporta nell'alcool a 70 %, dopo altre 24 ore si pone in glicerina, e questa si cambia finchè non

<sup>1)</sup> *Zeit. wiss. Mikr.*, 10. 1893, p. 49. Invece dell'alcool assoluto si adoperi quello a 90 %, correggendo le dosi così: acqua distillata 16 vol., alcool a 90 %, vol. 24.

reagisce più acida. In tal modo si possono isolare i nervi della catena ventrale fino alla pelle.

Recentemente l'APÀTHY<sup>1)</sup> ha così indicata la miscela: acqua, alcool e glicerina parti eguali; si aggiunga 15% di acido acetico glac. e 10% di acido nitrico concentrato.

Per il tessuto nervoso viene raccomandato il liquido del LANDOIS (soluzione satura di cromato d'ammoniaca cc. 3, idem di fosfato potassico, idem di solfato sodico; si aggiungono 60 cc. di acqua distillata).

**162. Digestione.** — Per lo studio dell'epidermide la macerazione si ottiene mediante la digestione del tessuto per 3-4 ore alla temperatura di 47° C. nel succo gastrico o nella soluzione satura di pancreatina nell'acqua fredda. In questo modo i nuclei e la forma delle cellule spinose si mantengono inalterati.

**163. Dissezione.** — Di questa operazione, che consiste nel porre un animale, o un organo o una parte di esso, sotto un liquido indifferente (in una cassetta rettangolare, sul cui fondo c'è uno strato di cera che permette, con l'infissione di alcuni spilli, di trattenere in posto l'organo o l'animale), per poi procedere con gli aghi, le forbici ed il bisturi, all'isolamento ed alla separazione della parte da studiare; operazione che, a seconda delle circostanze, si fa ad occhio nudo o con la lente BRÜCKE, non credo sia il caso di trattenermi qui. Più che della tecnica microscopica, essa fa parte di quella zootomica propriamente detta: esce dunque dai confini di questo Manuale.

**164. Siringa economica da iniezioni.** — Beninteso, intendo dire solo per iniezioni delicate, istologiche. Si prenda un tubo di caucciù sottile e lungo 30-50 cm., si tenga un estremo in bocca e si infili all'estremo opposto un pezzetto di tubo di vetro con una punta molto affilata e ripieno del liquido colorato da iniezione. Quindi si appronti nella cassetta di zinco l'organo dell'animale, che sarà già aperto e dissezionato sott'acqua, ed, aiutandosi anche con la lente BRÜCKE, si cerchi di arrivare con la punta di vetro (che può raggiungere la sottigliezza di uno spillo) al vaso o al condotto nel quale si vuol penetrare. Quando si è sicuri di essere a posto, e si avranno sempre tutte e due le mani libere per aiutarsi e per mantenere stretti i tessuti intorno alla punta, basterà spingere il liquido soffiando.

**165. Anestesia, uccisione, preparazione di animali. Iniezioni di sistemi d'organi.** — Anche queste operazioni sono di competenza della

---

<sup>1)</sup> *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1897, p. 728.

zootomia, e non credo quindi opportuno di trattenermici specialmente. Del resto si veda più avanti il capitolo XXV

**166. Preparati permanenti in toto.** — Molto materiale, come uova, larve, piccoli blastodermi, piccoli animali, membrane, possono essere conservati *in toto*, perchè, se preparati nei modi voluti, sono visibili anche con i più forti ingrandimenti.

Le uova di molti invertebrati hanno il vitello molto oscuro, e ciò ne impedisce lo studio *in toto*; a questo si rimedia col tenerle per qualche giorno, come ha proposto il WILSON, nella miscela di acqua, glicerina ed alcool a parti eguali, ai quali si aggiunge 2 % di acido acetico.

Una difficoltà generale per tutte queste preparazioni consiste, a cagione della piccolezza dell'oggetto, nel trasporto di esso da uno all'altro liquido e nelle numerose manipolazioni necessarie, che ne mettono in pericolo l'incolumità. Per le uova, i piccoli animali e le larve si riesce abbastanza bene ad evitare qualunque danno col prendere l'oggetto nel liquido stesso che lo contiene mediante l'ansa di platino (§ 158) o con una pipetta a punta poco affilata e piuttosto larga (bisogna averne di dimensioni diverse); in tal maniera l'oggetto non viene mai toccato da un corpo solido fino a quando è al sicuro fra i due vetri. Ma per le piccole membrane e per i blastodermi delle uova meroblastiche il metodo dell'ansa o della pipetta non giova, perchè la membrana si accartocchierebbe mentre viene levata dal liquido e difficilmente si potrebbe distendere. D'altronde, nella chiusura del preparato, può essere molto importante di tenere la membrana con una data superficie in alto e l'altra in basso; ora questa operazione è difficile compierla al momento opportuno.

Tutte queste difficoltà possono essere tolte di mezzo col seguente semplicissimo espediente. Al momento di preparare la membrana, il blastoderma, ecc., invece di fare il trasporto in un recipiente incavato (vetro da orologio, saliera, ecc.), si depone l'oggetto contenuto nel liquido indifferente (oppure già fissato, ma anche in questo caso passato in un liquido acquoso) sulla lastra portaoggetti; qui si diminuisce con della carta bibula il liquido circostante, in modo che non ne rimanga che poca quantità intorno alla membrana. Ciò fatto, si prende una goccia di albumina glicerinata del MAYER (§ 133), si depone accanto, ma non a contatto, del liquido, e con un ago si fa un ponte di comunicazione fra i due liquidi, in modo che, a poco a poco, l'albumina passerà sotto la membrana. Intanto dalla parte opposta, con un poco di carta bibula, si cerca di diminuire quanto più si può il liquido. Si prende ora una goccia di alcool forte (85-90 %) e si mette in vicinanza, ma non a contatto, della membrana, quindi si fa scorrere lentamente l'alcool, in modo

ch'esso bagni l'oggetto e l'albumina sottostante, che verrà così coagulata. Mettendo la lastra nella stufa a 35-40° C., si otterrà ancora meglio l'adesione. Adesso l'oggetto è saldato al vetro e si potranno fare tutti i passaggi e tutte le manipolazioni senza pericolo che la membrana possa più spostarsi.

Raccomando molto questo metodo semplice, ma utilissimo, e che non esige altro che un poco d'attenzione. Quanto all'albumina che rimane sotto la membrana, essa non sarà di danno nell'osservazione, perchè si tratta di uno strato sottilissimo; d'altra parte se ne potrà diminuire l'opacità lavando con alcool a 95 %, acidulato leggermente (0,1 %) con HCl, prima di disidratare con alcool assoluto e rischiarare.

Se poi occorre una trasparenza assoluta, si può evitare l'albumina al disotto della membrana, servendosi del metodo di APÀTHY, già descritto (§ 138). La membrana è distesa dentro alla cornice di albumina coagulata; si bagna con alcool a 95°, poi con alcool assoluto e quindi si ricopre col leggero strato di celloidina liquido. Si mette nell'alcool a 75 %, e poi si fanno tutti i trattamenti, senza pericolo di spostamenti.

Se l'oggetto si dovrà disegnare, e ciò non sia stato fatto a fresco o sul vivo, sarà bene farlo quando, dopo disidratato, è stato messo nel rischiarante. Specialmente se si tratta di un corpo di qualche spessore, e che si sia usato per rischiarante l'olio di legno di cedro, esso sarà molto più visibile di quando verrà chiuso nel balsamo sciolto con xilolo od altra sostanza, che ne abbassano sempre l'indice di rifrazione.

Per la chiusura nella resina (damar o balsamo del Canada) vedi le indicazioni date nel § 150.

**167. Compressione.** — L'oggetto fissato, indurito, disidratato e ben rischiarato, per essere osservato e disegnato *in toto*, può non essere abbastanza visibile, perchè troppo grosso. In questo caso bisogna ricorrere ad una compressione esercitata egualmente e delicatamente. Parecchi compressori sono stati inventati; ricordo quello del FOL <sup>1)</sup>, modificato dal MONTICELLI <sup>2)</sup>. Consistono essenzialmente in un cilindro di ottone che penetra in un altro e che comprime due vetri tra i quali è collocato l'oggetto.

In molti casi, specialmente se l'oggetto non è di grandi dimensioni e non è molto grosso, ho trovato comodo di comprimerlo in questo modo semplicissimo. Chiuso il preparato nel rischiarante, oppure già messo nella resina, lo ricopro con un vetrino non troppo

<sup>1)</sup> *Lehrbuch, etc.*, p. 88.

<sup>2)</sup> *Zeit. wiss. Mikr.*, 11. 1894, p. 454.

grande, e lo colloco sul tavolino del microscopio bene centrato; abbasso il tubo finchè l'obiettivo tocca il vetrino; allora con la vite micrometrica comprimo leggermente e per un certo tempo, continuando ad abbassare il tubo; poi mi fermo e sospendo l'operazione, ma lascio tutto in posto per una mezz'ora.

Si adopera un obiettivo debole, per esser certi che non è la lente che tocca il vetrino, ma il contorno metallico; e si starà bene nel centro del vetrino, per non insudiciare l'obiettivo con la resina o con l'olio.

## CAPITOLO XV

### Orientamento di oggetti difficili, e ricostruzione delle sezioni.

**168. Generalità.** — È di grande importanza, in molti casi, di fare le sezioni secondo una data direzione <sup>1)</sup>, e per questo è necessario che il pezzo sia messo dentro alla paraffina in una determinata posizione, che permetta di orientarsi con precisione quando si deve cominciare a tagliare. La cosa è molto meno facile di quanto si può credere a prima vista; anzi in parecchi casi un esatto orientamento del pezzo si raggiunge con molta pena, e non sempre ci si arriva.

Quando il pezzo è piccolo e non è colorato *in toto*, esso è poco visibile; occorre allora riscaldare la piastra di vetro dove si sono messe le forme; ed appena versata la paraffina e fatto il trasporto dell'oggetto dentro di essa, portare tutto sul tavolino del microscopio da dissezione, e con l'aiuto della lente, servendosi di due aghi, collocare l'oggetto nella direzione e nel modo voluto. Staccate le forme

---

<sup>1)</sup> In tre determinate direzioni, disposte secondo tre piani perpendicolari fra di loro, si usa fare le sezioni; cioè: trasversali, sagittali e longitudinali o frontali. Si dicono sezioni *trasversali* quelle che sono in un piano perpendicolare all'asse longitudinale del corpo di un animale o di un embrione; sono *sagittali* quelle parallele al piano mediano di simmetria; si dicono *longitudinali* o *frontali* quelle che sono perpendicolari alle prime ed alle seconde e parallele al piano frontale. È ovvio che le sezioni trasversali e longitudinali sono simmetriche, mentre non lo sono quelle sagittali. Ma una metà del numero totale di queste ultime sarà esattamente identica all'altra metà, il che non può essere, nè per le trasversali, nè per le longitudinali. S'intenda che qui si parla sempre di animali a simmetria bilaterale.

In alcuni organi si fanno sezioni tangenziali e radiali, così, per esempio, nel cervello; è facile capire che nel primo caso esse sono parallele alla superficie dell'organo, e nel secondo perpendicolari.

dopo il raffreddamento della paraffina nell'acqua fredda, bisognerà fare qualche segno convenzionale su di una o più facce del blocco perchè, quando esso si ritaglia e si attacca al portaoggetti, possa essere messo nella posizione desiderata. Sarà anzi da consigliare di fare subito questa operazione, cioè di attaccare il blocco al cilindro di legno, perchè potrebbe darsi che poi si dimenticasse il significato dei segni convenzionali.

Convieni adunque avere un certo numero di tali cilindri di legno già preparati e sui quali si segna un numero che corrisponde a quello di un registro, che porta l'elenco dei pezzi con tutte le indicazioni necessarie.

Nel ritagliare il blocco, per ridurlo delle dimensioni desiderate, non è raro che avendo asportate tutte le facce primitive, si dimentichi qual'è l'orientazione, proprio nel momento che si sta per disporre il pezzo sul portaoggetti. Un modo comodo di ovviare a questo inconveniente è il seguente, che ha anche il vantaggio di riunire un certo numero di oggetti piccoli con la stessa orientazione.

Si prende una fetta sottile ed esattamente rettangolare di fegato indurito nell'alcool; il fegato amilaceo si presta meglio, ma serve anche un pezzo sano, purchè si evitino i tratti dove sono grossi vasi o connettivo in abbondanza. Si mette la fettina in una vaschetta con l'acqua e si porta sotto al microscopio semplice. Gli oggetti da orientare sono messi alla superficie della fettina di fegato e con gli aghi orientati nel modo desiderato; si leva l'acqua con una pipetta e si versa sopra la fettina con i pezzi una goccia di albumina glicerinata del MAYER. Quindi si fa arrivare con precauzione dell'alcool a 90 %, che coagula l'albumina; si lascia poi la fettina immersa nello stesso alcool per 10-15 minuti, perchè i pezzi restino ben attaccati, e si procede dopo alle operazioni necessarie per fare l'imparaffinamento o il rivestimento con la celloidina. Non occorre fare sul blocco alcun segno; perchè quando si toglie la sostanza soverchia di rivestimento è facile scorgere, per il suo colore abbastanza vistoso, la superficie rettangolare della fetta di fegato; e riesce quindi anche facile attaccare il blocco e fare le sezioni in una direzione perpendicolare ad uno, e quindi parallela all'altro, dei lati del rettangolo. Se poi si deve fare la colorazione delle sezioni resterà naturalmente tinto anche il tessuto epatico e quel po' d'albumina, che sta fra esso e l'oggetto da studiare, ma ciò non costituisce un inconveniente.

Con questo modestissimo espediente si possono avere senza fatica delle sezioni rigorosamente orientate anche di pezzi molto piccoli.

Talvolta la difficoltà dell'esatta orientazione del pezzo, già imparaffinato e messo sul microtomo, dipende dall'essere esso non colorato, sì che traspare poco attraverso la massa della paraf-

fina; certi tessuti poi prendono, quando sono disidratati e rischiarati senza essere colorati, una tinta ed un aspetto che si confondono con la paraffina che li riveste. In questo caso, per riconoscere la forma dell'oggetto con sicurezza (e molte volte quando si conosce la forma si ha un elemento sufficiente per determinare l'orientazione), basta, prima di passarlo nell'alcool forte, colorarlo leggermente con dell'emallume, tenendovelo per non più di uno o due minuti. Questa colorazione rimane superficiale, non essendovi il tempo occorrente perchè possa penetrare all'interno, e non produce alcun inconveniente quando si vorranno poi colorare le sezioni.

Se la forma del corpo imparaffinato è tale da non poter dare, neanche con questo mezzo, l'indicazione di quale è la parte anteriore o posteriore, superiore o inferiore, bisognerà ricorrere a qualche espediente, per esempio lasciar attaccato un altro pezzetto di tessuto all'organo che si vuole studiare, in una posizione determinata; oppure si può introdurre un piccolo pelo rigido in una parte del pezzo od anche, se di questo si è potuto seguire l'orientamento fino al momento dell'imparaffinamento, mettere vicino al pezzo stesso, quando lo si versa nella paraffina, un poco di filo nero o, meglio, un pezzo di capello, che faccia da guida, ponendolo in una direzione e posizione determinata.

Talvolta si è anche tenuto conto esatto dell'orientamento durante l'imparaffinamento, ma l'oggetto non è più visibile fin che si prepara il blocco e che lo si attacca al portaoggetti del microtomo; di modo che durante questi maneggi si può smarrire l'orientamento. In questo caso, appena levato il blocco dalle forme, si sporca con del nero-fumo sciolto nella benzina uno dei lati di esso che corrisponda ad un lato determinato dell'oggetto, e si avrà cura di lasciare inalterata quella faccia annerita.

Molte volte bisogna poter fare dalle sezioni la ricostruzione grafica dell'oggetto, od anche ottenere addirittura un modello. Tanto nell'uno che nell'altro caso la ricostruzione esatta non è possibile se tutte le sezioni non sono riferite a dei punti fissi, indipendenti dall'oggetto, cioè al di fuori d'esso. Vero è che in molti casi, nei quali non si richiede una esattezza rigorosa, i punti di riferimento possono essere presi nell'oggetto stesso, ma non sempre questo è possibile, e d'altronde non è sempre sufficiente. Si supponga, per esempio, di voler fare una ricostruzione grafica di un organo, un vaso poniamo, di embrione di vertebrato; si potrà prendere per punti di riferimento il contorno della corda, dell'arteria sottostante, ecc., nel caso che si tratti di sezioni trasverse; ma se per speciali ragioni le sezioni devono essere sagittali o frontali, quei due organi non possono più essere utilizzati. E non sarebbe da consigliare, altro che in qualche caso speciale, di servirsi del contorno esterno, formato



dalla pelle perchè questa, nella fissazione, può aver subito delle notevoli deformazioni, essere più o meno allontanata dagli organi sottostanti.

Un piano di riferimento può essere dato, anche dalla superficie della fettà di fegato, della quale ho detto più sopra; oppure essa può essere sostituita da un nervo annerito con l'acido osmico, per esempio, lo sciatico della rana. E l'uno e l'altro metodo sono certo molto superiori a quelli consigliati e adoperati da taluno, del filo o del pezzetto di carta immerso col pezzo nella sostanza di rivestimento.

Oggetti molto piccoli (uova, larve, ecc.), visibili finchè sono nel rischiarante, non possono più essere orientati quando s'imbevono di paraffina, perchè diventano opachi. In questo caso tutti gli espedienti fin qui suggeriti diventano inutili.

Bisogna allora ricorrere al metodo di APÀTHY. L'oggetto, dopo disidratato, è rivestito con la celloidina; quando questa è solidificata, si ritaglia il blocco in forma di un dado di circa 1 cm. di lato, in modo che l'oggetto sia, all'incirca, nel centro. Si mette nella glicerina pura (o nell'olio di cedro) perchè si rischiarì e divenga trasparente; quindi si trasporta sul tavolino del microscopio da dissezione. Esaminata la posizione dell'oggetto, per stabilirne l'orientazione, si ritaglia a poco a poco il dado, riducendolo ad un piccolo parallelepipedo, nel quale l'oggetto sia collocato simmetricamente rispetto alle facce del solido, e molto vicino ad una di esse.



Adesso non resta che fare il rivestimento con la paraffina (§ 117) e poi tagliare il blocco, finchè si riconosce il parallelepipedo di celloidina; si attacca il pezzo al portaoggetti del microtomo; ponendolo nella posizione opportuna per avere le sezioni orientate.

**169. Metodo Born.** — Dei diversi metodi per avere un piano di riferimento descriverò brevemente quello di BORN e PETER, con le ultime modificazioni introdottevi, servendomi della prolissa descrizione datane dagli autori <sup>1)</sup>. I quali cominciano dal raccomandare che i disegni delle sezioni, piuttosto che con la camera chiara da disegnare, vengano fatti con l'apparecchio da proiezione; e certa-

<sup>1)</sup> G. BORN e K. PETER, *Zur Herstellung von Richtebeunen und Richtlinien*, in *Zeit. viss. Mikr.*, 15. p. 31, 1898.

mente così si risparmia molto tempo, ma c'è l'inconveniente che l'apparecchio è costoso.

Su di una piastra di vetro di 5-6 cm. di lato, o di diametro, s'incidono in un quadrato centrale, avente 2 cm. di lato, da 15 a 20 rette esattamente parallele e profonde mm. 0,1. Alla faccia opposta si traccia una croce in nero, esattamente centrata col soprastante quadrato formato dalle rette incise. Si capisce che un pezzo simile viene a costare piuttosto caro; gli autori ne ebbero da un negoziante di Breslau per il prezzo di 5 marchi, ma lo ZEISS di Jena ne richiese 20 marchi. Su questa piastra si prepara la cavità rettangolare, mettendovi le due forme del LEUCKHART. Queste devono essere col lato corto di 2 cm., cogli angoli rigorosamente retti e le superficie piane. Si unge leggermente con glicerina allungata con un terzo di alcool forte, e si sta attenti che le scanalature siano ben pulite, senza pezzetti di sostanze estranee. Piastre e forme vengono riscaldate lentamente, si mettono dentro una vaschetta di vetro e il tutto si trasporta sul microscopio da dissezione, dopo avere versato all'interno della cavità la paraffina fusa e portata a 5-10° C. oltre il punto di fusione. Lo specchio del microscopio permetterà di vedere la croce nera anche quando il fondo della paraffina comincia a solidificarsi. L'oggetto portato con una spatolina calda, viene orientato con due aghi riscaldati, servendosi di guida della croce nera. L'orientamento va fatto in modo che la sezione del taglio possa farsi in una direzione esattamente perpendicolare alla direzione delle scanalature parallele incise sul vetro. Si mette dell'acqua fredda (al caso raffreddarla con ghiaccio) dentro la vaschetta, finchè arriva all'orlo superiore delle forme, e con una piccola spatolina metallica, leggermente riscaldata, s'impedisce che la superficie superiore della paraffina si raffreddi rapidamente, e nello stesso tempo con una pipetta riscaldata si aggiunge a goccia a goccia della paraffina fusa. In questo modo si otterrà che la superficie superiore, quando si solidifica, rimanga piana. Dopo si aggiunge dell'altra acqua fredda, e si lascia dentro il blocco a lungo, cioè per delle ore. Esso si staccherà allora facilmente e sul fondo si troveranno segnate in rilievo tante strie quante erano le scanalature incise nel vetro.

Questa superficie deve ora venire ricoperta con una vernice nera che si prepara aggiungendo in un vetro da orologio a due gocce di collodio alcune gocce di alcool assoluto e una punta di coltello di nerofumo; si stempera rapidamente e rapidamente si applica. Poi si ricopre con una mano di vernice fatta sciogliendo dello *shellac* (lacca bianca) nell'alcool assoluto. Ora si attacca il blocco al portaoggetti in modo che le strie rimangano in una direzione rigorosamente perpendicolare al piano di sezione e poi si ritaglia accuratamente il blocco a forma di prisma triangolare, in modo che una delle facce

sia costituita dal piano di definizione ; ed è questo che si presenterà al filo del coltello. Ciò fatto s'immerge il prisma nella paraffina eguale a quella adoperata per il rivestimento, ma portata alla temperatura di 75° C., e si ripete l'immersione parecchie volte, sì che il piano di definizione rimanga coperto da qualche millimetro di paraffina.

Si lascia raffreddare e poi si taglia. Le sezioni tagliate ed attaccate mostreranno una linea nera a zig-zag, che sarà la linea di definizione.

Si può fare il rivestimento anche con la celloidina. In questo caso si attaccheranno prima le forme fra di loro e alla piastra di vetro con un poco di vernice di *shellac*. Si versa la celloidina densa, si orienta l'oggetto e si lascia solidificare lentamente all'aria per 2-3 giorni (meglio, direi, nei vapori di cloroformio), poi si passa nell'alcool a 80 %; qui la vernice si scioglie e il blocco rimane isolato. Bisognerà avere prima impedita la presenza delle bolle d'aria nella massa, col metodo che ho già indicato (§ 116). Per dipingere il piano di definizione lo si asciuga prima e poi si applica questo miscuglio: blu di Prussia 10, trementina 50, etere 150. Non occorre coprire la pittura.

Fatte le sezioni, non tutte sarà necessario di proiettare e di disegnare; ma, a seconda dell'importanza del pezzo e dello spessore delle fette (e si faranno quanto più grosse possibile, conciliando lo spessore con le esigenze dell'osservazione), se ne prenderà una ogni 5, una ogni 10, e questi disegni o proiezioni serviranno sia per la ricostruzione grafica che per il modello. Solo in casi eccezionali, di organi molto difficili, si dovranno disegnare tutte le sezioni.

Questo metodo di BORN, che esige niente di speciale, all'infuori della piastra di vetro con le scanalature incise, è il più esatto di quanti si conoscano, e non è neanche più complicato di altri, quello del KASTSCENKO, per esempio <sup>1)</sup>, e che non credo utile quindi di descrivere.

Invece un metodo molto più semplice è quello del WOODWORTH, che consiste nel mettere sul fondo della cavità, formata dalle forme del LEUCKHART, un pezzo di carta che porta leggermente rilevate delle rette che s'incrociano ad angolo retto.

Versata la paraffina, orientato l'oggetto in modo che il piano di sezione sia parallelo ad una delle due serie di strie, lasciato raffreddare il blocco e tolto via dalle forme, si avrà la superficie inferiore sulla quale sono leggermente incise le striature della carta; allora basterà stendere su quel piano di definizione una tinta nera e si

<sup>1)</sup> *Zeit. v. Wiss. Mikr.*, 4. 1888. p. 235-353; 5. 1889. p. 173.

attaccherà al portaoggetti, per fare le sezioni. Queste avranno da un lato la stria nera che servirà come linea di definizione. Si stia attenti di non riscaldare troppo le sezioni per distenderle, perchè potrebbe fondere il colore nero insieme con la paraffina.

**170. Ricostruzione grafica.** — Lo scopo che ci si propone con un esatto orientamento degli oggetti e col provvedere le sezioni di una linea di riferimento è quello di poter fare la ricostruzione di un organo, di una larva, di un embrione, anche di un intero animale, per poterne ben comprendere la forma e l'organizzazione. La ricostruzione può essere solida, ossia si possono ottenere dei modelli ingranditi di tutto l'organo, l'embrione, ecc.; ma questa ricostruzione, certo utilissima, esige molto tempo e lavoro e non è nel maggior numero dei casi necessaria, ne dirò quindi brevemente più avanti. Invece la ricostruzione grafica, benchè esiga anch'essa parecchio tempo, è più breve e di uso più frequente di quella solida.

La più semplice ricostruzione grafica è quella di proiezione sullo stesso piano di sezione. Supponiamo di avere, per esempio, un piccolo embrione, del quale occorre conoscere un dato organo. Si fa prima il disegno della sezione sagittale mediana, e quindi i disegni, a intervalli eguali, di altre sezioni sagittali esterne a quella mediana, servendosi di carta molto sottile. Quindi si sovrappongono successivamente e ordinatamente questi disegni in modo da vedere l'insieme dell'organo che si vuole studiare e che si potrà figurare tutto proiettato sulla sezione mediana. Si capisce che in molti casi non basterà il solo contorno, ma occorrerà aiutarsi con dei chiaro-scuro. È ovvio poi che non si ricorrerà alle sezioni sagittali quando si tratta di un organo che ha un percorso marcatamente trasversale al piano mediano. In questo caso si faranno le sezioni frontali (longitudinali) o trasversali.

In generale, quando si tratta di oggetti aventi una forma allungata si preferisce fare le sezioni trasversali, perchè più piccole e quindi più facili ad ottenere; inoltre rimane in questo caso anche più facile orientare il piano di sezione esattamente perpendicolare all'asse longitudinale. Ma nel caso delle sezioni trasversali sarà solitamente di poca utilità la proiezione sullo stesso piano. Allora essa può farsi in uno qualunque dei due altri piani perpendicolari a quello trasversale; cioè il frontale e il medianò. In tal modo si vede che anche avendo un solo esemplare disponibile, possiamo avere la ricostruzione completa, quando si possiedono le sezioni in una direzione e le proiezioni nelle altre due.

Supposto che i disegni si siano fatti ogni 5 sezioni, che queste siano di 10  $\mu$  e che l'ingrandimento sia di 100 volte, dovrò tracciare su di un foglio di carta delle rette parallele distanti 5 mm. l'una dall'altra. Ognuna di queste rette rappresenta la proiezione verticale

del piano di una sezione. Io dovrò quindi su ciascun disegno tracciare una retta immediatamente esterna ad esso e in direzione corrispondente al piano nel quale si vuol fare la proiezione. Mediante due squadre esatte potrò tracciare tante rette parallele fra di loro e perpendicolari alla retta di proiezione, le quali indicheranno su quest'ultima con altrettanti punti i diversi tratti del disegno. Naturalmente bisognerà ridurre questi punti di proiezione al minimo necessario, e non farli per tutti gli organi dei quali il disegno dà la sezione. Se poi fosse necessario proiettarli tutti, si dovranno adoperare per le rette di proiezione tanti colori che corrispondano ai colori convenzionali dei singoli organi. I punti segnati così nella retta di ciascun disegno saranno riportati esattamente, lucidandoli, sulla retta che rappresenta quella sezione nel foglio preparato a rette parallele; e così si farà successivamente per tutti i disegni. Quindi unendo fra di loro i punti dello stesso colore col colore stesso si avrà la proiezione voluta.

Altrettanto, se occorre, si può fare in un piano perpendicolare al precedente preparando un altro foglio di carta e tracciando sulle sezioni disegnate delle rette perpendicolari a quelle di prima e sulle quali si segneranno i punti di proiezione.

**171. Ricostruzione solida.** — Con questa si può ottenere un modello ingrandito di un piccolo organo, come di un intero embrione, ecc. Il vantaggio di poter vedere realmente come è fatto un oggetto difficile, del quale dall'esame delle sezioni non avevamo potuto farci una chiara idea, è certo molto grande; ed è in questo modo che fu possibile, per esempio, figurare la formazione del cuore embrionale, dell'organo dell'udito, ecc. Ma questa ricostruzione esige molto lavoro e quindi grande perdita di tempo.

Bisogna prima prepararsi delle tavolette di cera (la sostanza ideale, come osserva giustamente il BORN, sarebbe quella che possedendo tutte le altre qualità della cera fosse trasparente) dello spessore corrispondente a quello che passa fra una sezione e l'altra ingrandita di un dato numero di volte. Così, per esempio, se mi propongo di disegnare una sezione ogni 3, e che ogni sezione è di 5  $\mu$  e l'ingrandimento di 60 volte avrò  $3 \times 5 \times 60 = 900$ , dovrò dunque preparare le tavolette dello spessore di mm. 0.9. La grandezza in superficie sarà proporzionata alle dimensioni massime del disegno da fare. Esse si fanno facilmente da sè, ma si trovano preparate in commercio (da GRÜBLER e C.) di qualunque spessore.

Disegnata su carta sottile la sezione, il disegno viene attaccato sulla tavoletta di cera e con una lama si ritaglia il contorno e le cavità interne, non dimenticando di lasciare sempre inalterata anche sulla cera la linea di direzione del disegno, anche se ciò impedisse di completare il contorno. Così si continuà a fare per tutte le sezioni dise-

gnate, alle quali dunque corrisponderanno altrettante tavolette. che saranno sovrapposte una all'altra. È di molta importanza che lo spigolo della tavoletta corrispondente alla linea di direzione sia sempre tagliato esattamente verticale alla superficie della tavoletta stessa; altrimenti, se lo spigolo è obliquo, nel sovrapporre una tavoletta all'altra la costruzione si sposterebbe dalla verticale. Anzi, per evitare questo pericolo, che porterebbe alla fine una notevole deformazione nel modello, credo opportuno di forare prima tutte le tavolette di cera in corrispondenza dei due estremi della retta di direzione, e forarle tutte in una volta in modo da essere certi che i fori sono sovrapposti e che le tavolette sono esattamente perpendicolari. Quindi via via che una tavoletta è stata preparata col disegno e forata viene infilata su due fili metallici rigidi, attaccati inferiormente ad una tavoletta di legno, ad una distanza esattamente corrispondente a quella che passa fra i due fori delle tavolette di cera. In questo modo si ha la sicurezza ch'esse stanno sovrapposte sulla verticale. È ovvio che per conservare i due fori e la retta di direzione non si può completare il contorno esterno dell'oggetto che si ricostituisce in quella parte che corrisponde a quei fori e a quella retta: ma se si è avuta l'avvertenza di collocare l'oggetto in modo che verso la retta di direzione sia una parte molto semplice ed uniforme si potrà facilmente completare il contorno dopo che tutte le tavolette sono sovrapposte: del resto si può completare subito tavoletta per tavoletta il contorno, lasciando due ponti di unione coi tratti di cera che portano i due fori.

Completato il modello in cera si può, volendo, ricavarne lo stampo, come si può fare il getto, per avere in rilievo gli organi cavi, versando del gesso da scultori nelle cavità e, dopo che questo è solidificato, fondendo la cera.

**172. Metodo Fol per la ricostruzione grafica** <sup>1)</sup>. — Molto più semplice e breve del precedente (§ 170), questo metodo è da consigliarsi, nel maggior numero dei casi, quando non occorre una precisione assoluta.

L'oggetto da sezionare, dopo disidratato con l'alcool assoluto, verrà rischiarato con olio di legno di cedro, ed in questo liquido se ne farà un disegno, cercando di tracciare, con la maggiore esattezza possibile, il contorno esterno. Ora questa non è una cosa facile, anzi presenta diverse difficoltà. Prima di tutto può darsi che l'oggetto abbia una conformazione tale che sia difficile tenerlo in una posizione determinata, o di fianco, o sul dorso o sul ventre; ma può tro-

<sup>1)</sup> FOL, *Lehrbuch, etc.*, 1884, p. 85.

varsi più o meno contorto, di modo che il contorno non riesce nè esattamente laterale, nè esattamente dorsale, ecc. Se l'ingrandimento dell'oggetto dev'essere di qualche entità (e in genere esso raggiunge i 50 diametri e solo eccezionalmente i 100) e se l'oggetto stesso non è molto piccolo, non lo si potrà vedere tutto nel campo del microscopio per disegnarlo alla camera chiara. Allora bisognerà ingegnarsi col fare il disegno ad un ingrandimento minore e ricorrendo poi ad un pantografo (ve ne sono di semplicissimi, che per un ingrandimento del semplice contorno sono più che sufficienti), per arrivare alle dimensioni volute. Fatto il contorno, l'oggetto sarà imparaffinato ed orientato esattamente.

Quando si sia fatto il disegno del contorno dell'oggetto all'ingrandimento voluto, corrispondente a quello da usarsi nell'osservazione delle sezioni, il metodo FOL è di una facilità e rapidità grandissime. Sul disegno si tracciano tante rette esattamente parallele e corrispondenti ai piani di sezione da osservare. Così, per esempio se io ho disegnato un embrione di fianco, e se mi propongo di fare delle sezioni trasversali e di prenderne in osservazione una ogni 10, facendole dello spessore di  $10 \mu$  ed impiegando l'ingrandimento di 50 diametri, avrò  $10 \times 10 \div 50 = 5000 \mu$ . Dovrò dunque condurre le rette parallele a 5 mm. di distanza.

Ciò fatto su di un pezzo di carta oliata resistente e spessa quanto più si può (il FOL veramente consiglia una lastra di vetro, sulla quale si stende uno strato di gelatina e che poi si taglierà con un diamante), si tracciano delle rette esattamente parallele e molto ravvicinate fra di loro, per esempio a 2 mm. una dall'altra. Queste rette devono essere molto sottili e tracciate con diversi colori, quattro o cinque, che si seguono e si ripetono nello stesso ordine. Così per esempio, traccio una linea nera, una blu, una rossa, una verde, una gialla; e poi daccapo nero, blu, rosso, ecc.

Con un taglio perpendicolare a queste rette colorate divido in due parti, una molto più piccola dell'altra, la carta oliata; quindi applico il pezzo più piccolo sul disegno dell'oggetto in modo che l'orlo tagliato corrisponda alla prima retta che rappresenta il piano della prima sezione. In questa guisa le linee colorate verranno a trovarsi perpendicolari alla retta suddetta e collocherò il pezzo di carta in modo che due di quelle linee colorate corrispondano, con la maggior approssimazione possibile, ai due punti dove la retta che rappresenta il piano del disegno interseca il contorno dell'oggetto. Ora si sovrappone il pezzo maggiore della carta che porta le linee colorate sul disegno della prima sezione presa in osservazione e si dispone in modo che due tangenti al contorno siano di colore corrispondente alle due dell'altro pezzo colorato che segnano il contorno del disegno. Mi pare inutile dire che la carta dev'essere situata sopra il disegno

orientato, cioè situata in modo da corrispondere alla posizione che la sezione avrebbe rispetto al disegno dell'oggetto.

Sulla carta si segnano, con leggeri punti a lapis, in corrispondenza delle linee colorate, quelle parti del disegno delle quali interessa fare la ricostruzione grafica, e quindi si traccia sulla retta che rappresenta il primo piano di sezione altrettanti punti riferendosi alle linee colorate corrispondenti del piccolo pezzo. Si abbia l'avvertenza di segnare gli organi diversi con diversi colori, quando non ci si limita alla ricostruzione di un solo organo.

L'operazione verrà identicamente ripetuta per tutti i disegni successivi; e se i punti da seguire sono molti, sarà comodo dare dei numeri progressivi alle linee colorate, ripetendoli con degli indici per ogni serie. Così: nero, blu, rosso, verde, giallo = 1, 2, 3, 4, 5, e poi 1', 2', 3', 4', 5', quindi: 1'', 2'', 3'', 4'', 5'', ecc. Alla fine dell'operazione si uniranno sul disegno tutti i punti segnati sulle rette parallele, rappresentanti i piani di sezione, con delle linee di colore eguale a quello convenzionale dell'organo relativo, e così sul disegno avremo una ricostruzione grafica degli organi desiderati. Se il disegno è stato fatto di fianco, la ricostruzione sarà sagittale, cioè parallela al piano mediano: se il disegno era preso dalla parte ventrale o da quella dorsale, la ricostruzione sarà longitudinale, cioè nel piano frontale.

Questo metodo di ricostruzione, che nella descrizione appare lungo e complicato, in realtà è molto sollecito e semplicissimo, quindi lo consiglio caldamente in tutti i casi nei quali non è necessaria una esattezza matematica.

## CAPITOLO XVI.

### Conservazione e collezione di preparati.

Chiusi nella resina i preparati non possono essere messi da una parte, senza segnarli in qualche modo, per poter facilmente ritrovare quello che occorre, quando se ne abbia una quantità rilevante.

**173. Dimensioni delle lastre (portaoggetti).** — La misura comune è il formato inglese di mm.  $26 \times 76$ ; ma è preferibile, per la larghezza maggiore, il formato Stazione Zoologica di Napoli di mm.  $27 \times 67$ . Migliore di tutti, secondo me, è il formato che ha la larghezza di quello napoletano e la lunghezza di quello inglese cioè  $27 \times 76$ . La maggior larghezza del formato Stazione Zoologica permette l'uso di vetrini (coprioggetti) delle dimensioni di millimetri  $40 \times 22$ , che non potrebbero esser messi sulle lastre inglesi. Ma appunto con questi vetrini così grandi il formato napoletano



non lascia che poco spazio libero ai due lati, dove si devono mettere i cartellini, od in altro modo si segnano le indicazioni che si riferiscono al preparato. Quindi la maggior lunghezza del formato inglese si presta di più.

Per scrivervi sopra col lapis sono comode anche le lastre che hanno una porzione della superficie smerigliata (fig. 30).

Tali lastre sono adatte nel maggior numero dei casi, ed è bene per quanto possibile, non ricorrere a lastre più grandi, non solo perchè sono molto più costose, ma perchè sono realmente scomode tanto nell'osservazione al microscopio, quanto per la conservazione. Tut-

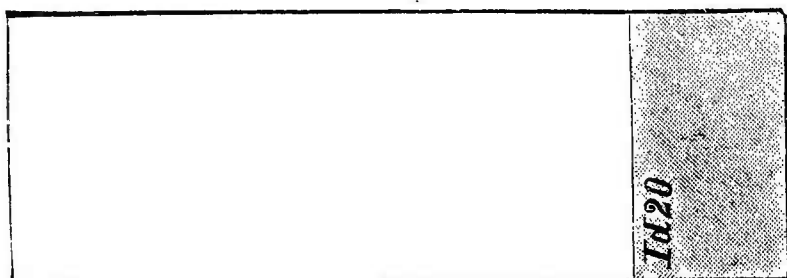


Fig. 30. — Portaoggetti con una porzione della superficie smerigliata.

tavia quando dobbiamo fare delle sezioni molto grandi, le lastre e i vetrini più grandi si rendono necessari. Misure che si trovano in commercio sono quelle di mm.  $86 \times 36$ . Ma dietro ordinazione si possono avere anche di  $90 \times 47$  ed oltre. Queste lastre permettono di adoperare vetrini di, rispettivamente, millimetri  $60 \times 30$  e millimetri  $80 \times 40$ .

**174. Vetrini (coprioggetti).** — Questi devono essere sempre perfettamente piani, senza bolle o altri difetti e di spessore uniforme su tutta la loro superficie; debbono poi essere perfettamente trasparenti. Lo spessore minimo è di mm. 0,1; ma non è necessario che raggiungano questa sottigliezza, basta, per le ricerche più delicate, che non oltrepassino mm. 0,16, dimensione calcolata dai fabbricanti di microscopi per gli obiettivi apocromatici. Quando si tratta di vetrini grandi, bisognerà contentarsi di spessori maggiori, cioè mm. 0,2, e anche per i più grandi mm. 0,25. Questi spessori non impediscono l'osservazione anche con obiettivi apocromatici ad immersione aventi l'angolo d'apertura 1.30.

Le forme dei vetrini sono tre: circolare, quadrata, rettangolare. Le dimensioni per i circolari sono mm. di diametro 16, 18, 20. Per quelli quadrati: lato mm. 16, 18, 20, 24. Per superficie maggiori si presta di più la forma rettangolare: e sono comode le dimensioni:  $24 \times 16$  e  $40 \times 22$ .

Per le grandissime dimensioni abbiamo le misure già ricordate di  $60 \times 30$  e  $80 \times 40$  <sup>1)</sup>.

**175. Indicazioni sui portaoggetti.** — Possono farsi semplicemente col mettere un numero da un lato, numero che corrisponde ad un altro scritto su di una scheda o su di un piccolo registro. Per scrivere sul vetro in modo indelebile si può adoprare il diamante; ed anzi per non avere la noia di fare il lavoro da sè, si può acquistare i portaoggetti, esigendo che ognuno porti inciso un numero progressivo. Volendo scrivere con l'inchiostro, serve bene la miscela a parti eguali di inchiostro di china liquido e silicato potassico (vetro solubile) soluzione al 10 % dello SCHOEBEL, o si può anche usare un lapis grasso a colori.

Ma, benchè si possa con questo metodo semplice fare tutte le indicazioni desiderate nel registro o nelle schede, sotto il numero corrispondente a quello segnato sul preparato, tuttavia è preferibile avere su di questo annotati i dati principali che si riferiscono alla preparazione. Infatti, con diversi preparati sott'occhio, è molto comodo di vedere con una semplice occhiata, se c'è o no quello che si desidera, senza fare delle noiose ricerche e dei confronti fra i numeri dei preparati e quelli del registro.

Se si tratta di poche parole, si può scrivere direttamente sul vetro; ma è molto meglio avere dei cartellini preparati, corrispondenti esattamente al formato del portaoggetti, ingommati al disotto, e che si attaccano sul portaoggetti; se il vetrino è piccolo, ci sarà lo spazio per metterne due, uno a destra e l'altro a sinistra del preparato <sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Un buon fabbricante specialista di lastre e di vetrini è il sig. WILHELM STENDER (Gerichtsweg, 9), Lipsia. Dietro richiesta egli manda il suo catalogo. Ricordarsi che i prezzi sono in Marchi = L. 1.25 oro.

Si eviti di comperare vetrini (coprioggetti) a Milano, perchè più d'una volta quelli fornitimi dal signor G. EISENTRAEGER erano inservibili, a cagione di una appannatura della superficie che non era possibile levare in nessun modo, nè con acidi, nè con alcali, nè con altre sostanze. Dubitavo ragionevolmente che questa appannatura dipendesse da un difetto di fabbrica, cioè dalla qualità del vetro. Ma fui assicurato ripetutamente per iscritto dal predetto signor EISENTRAEGER (uno dei più noti e accreditati negozianti di materiale scientifico che abbiamo in Italia) che la causa si deve cercare nell'enorme umidità di Milano. Non v'è dunque altro da fare che astenersi dall'acquisto.

<sup>2)</sup> È difficile avere una buona gomma. La migliore è quella *Queyriaux*, che si prepara con vera gomma arabica (comperarla in pezzi, non in polvere) 40 g. Acqua distill. 150 g. Da un'altra parte si diluisce a freddo 30 g. d'anido in 150 g. d'acqua e si aggiunge 20 g. di zucchero sciolti in 25 d'acqua. Si unisce questa miscela alla soluzione di gomma, si aggiungono 20 g. di bicarbonato di soda sciolti in 25 d'acqua e si fa bollire per 5 minuti. Si lascia raffreddare e si aggiunge qualche cristallo di tinol.

Le indicazioni sul cartellino saranno fatte metodicamente; si segnerà prima il nome dell'animale, embrione od organo, di cui si tratta; se il preparato è di sezioni, si aggiungerà subito la direzione (sagittale, longitudinale o frontale, trasversa) e lo spessore. Poi si potrà far seguire il liquido fissativo, la colorazione e infine la data col numero d'ordine.

L'APÀTHY adopra un espediente comodo per poter unire al preparato stesso non solo le indicazioni sommarie sopra notate, ma anche quelle più estese che possono interessare, per ricordare, ad esempio, quel che c'è di notevole nel preparato. Si prende un rettangolo di

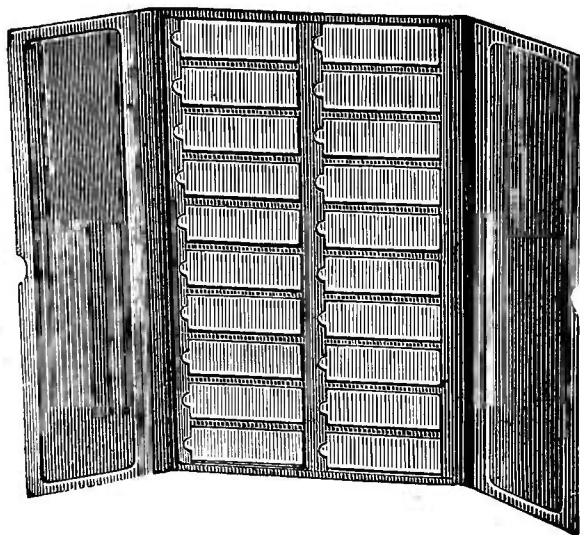


Fig. 31. — Scatola di cartone per 20 preparati.

carta, largo quanto il portaoggetti e lungo un mezzo centimetro di più. Si scrive su di esso quel che si desidera, lasciando vuoto soltanto un breve tratto di  $\frac{1}{2}$  cm., poco più, in corrispondenza di un lato corto, e questo tratto in bianco si attacca con la gomma alla parte superiore della lastra; tutto il rimanente del foglietto, cioè quello scritto, viene ripiegato al disotto, e il peso del vetro lo terrà disteso. Quando il preparato dev'essere osservato al microscopio, il pezzo di carta si solleva e si porta lateralmente all'infuori.

**176. Collezione di preparati.** — Finchè non sono in gran numero si possono tenere in quelle tavolette orizzontali, messe a foggia di cassetti nella tavola da lavoro. Ma quando il loro numero aumenta bisogna provvedere diversamente. Nei grandi laboratori si usa una specie di mobile, come una credenza o un armadio, a due battenti e nell'interno formata da tanti scompartimenti orizzontali, come dei cassettoni, fatti da tavolette con un orlo sporgente qualche millimetro nella parte esterna. In ognuno di questi si possono tenere molti preparati uno accanto all'altro, ed ogni cassetto può servire per un determinato gruppo di tessuti o di sistemi di organi.

Per piccole collezioni di preparati si prestano bene dei cartoni in tre pezzi, uno largo, suddiviso in due metà da una fascia pure di cartone, e sul quale si chiudono sopra gli altri due come in un tritico, avendo per battente la fascia mediana (fig. 31). Il vantaggio che si ha da una tal forma di scatola è che i preparati si scorgono tutti insieme a colpo d'occhio. Ma per viaggio non servono, perchè i preparati si addosserebbero e si sovrapporrebbero l'uno all'altro. In questo caso conviene ricorrere a quelle piccole e robuste cassette nelle quali i preparati sono disposti verticalmente e tenuti assolutamente isolati da incastri laterali (fig. 31 e 32).

Infine vi sono (ed è forse il modello preferibile) delle tavolette foggiate in modo che ogni preparato è separato dall'altro da delle

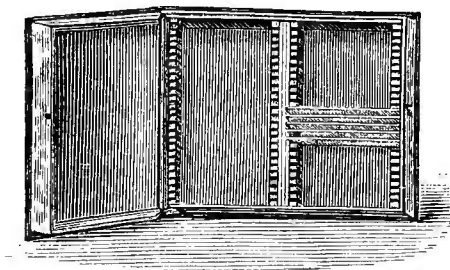


Fig. 32. — Cassetta per trasportare i preparati.

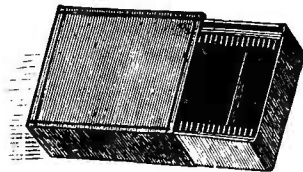


Fig. 33. — Scatoletta per trasportare i preparati.

strisce di legno e il fondo è di robusto cartoncino, incollato al legno con colla forte. Il vano rettangolare è fatto per servire alle lastre formato inglese e formato Stazione Zoologica. Ma si può averne per altre grandezze. Si possono fare tavolette piccole da 5-6 preparati in una sola fila, oppure più grandi in due, tre file, per 10-12, 15 preparati. Queste tavolette possono essere tenute isolate oppure raccolte ogni 15-20 e messe dentro una cassetta di legno che si apre dalla parte superiore e che quando è aperta lascia ribaltare in fuori un lato lungo (come in quelle scatole di cartone che servono negli uffici per tenere gl'incartamenti). Così è facilissimo levare una tavoletta qualunque, senza disordinare le altre. Il vantaggio poi di avere ogni lastra separata dalle altre è molto grande, perchè, oltre ad impedire che si tocchino e che si guastino, dà modo di tenere sotto ogni singolo preparato un rettangolo di carta con tutte le indicazioni che si riferiscono alle sezioni in esso contenute.

## CAPITOLO XVII.

## Laboratorio e suo arredamento.

**177. Il locale.** — Il locale destinato a laboratorio d'istologia sarà con la finestra rivolta a nord, o a nord-est, oppure ad est, ed avrà davanti una porzione libera di cielo, per potere raccogliere sullo specchio del microscopio i raggi di luce, senza riflessi dati da muri di altre case, e senza che vi arrivino i raggi solari diretti. Perciò la migliore esposizione è quella del nord o del nord-est. Se invece non si potesse avere che l'esposizione di levante (est), bisognerà rinunciare alle osservazioni nelle prime ore del mattino, quando cioè il sole penetra con i suoi raggi dentro dalla finestra. Poco adatti per laboratorio sono i locali esposti a mezzogiorno e ad ovest e quelli che hanno davanti alla finestra altri fabbricati elevati, che nascondono la vista del cielo.

Se il locale ha più d'una finestra dallo stesso lato niente di male, anzi potrà così servire per più di una persona; oppure permetterà di collocare davanti ad una finestra il microscopio e di fronte all'altra il microtomo, od altri stromenti che sono pur necessari, quali sarebbero il microscopio da dissezione, le lenti montate su piede, i vasi per lo studio del plankton, ecc. Se vi fossero finestre anche su di un'altra parete, che non fosse quella esposta a nord o a nord-est, bisognerà intercettare l'entrata alla luce, non solo con delle persiane esterne, ma anche con degli scuri, che si adattino bene al lato interno delle vetrate.

Quando la luce fosse troppa, essa potrà esser moderata con una tendina di semplice cotone (madapolan) bianco. Si possono mettere, internamente appoggiati ai telai dei vetri, dei leggerissimi telai di legno dolce, sui quali si è distesa e inchiodata la tendina di cotone. Se la scelta è possibile, saranno da preferire i locali piuttosto elevati in confronto di quelli a pianterreno e con le finestre verso un cortile o, meglio, verso un giardino, a quelli che guardano sulla strada.

Se la finestra è unica, ma ampia, ed abbastanza profondo il locale, si potrà mettere vicino alla finestra il tavolo col microscopio, e più indietro, verso il centro della stanza, quello per il microtomo. Se locale e finestra saranno poco ampi, bisognerà ingegnarsi con un solo tavolo, e davanti alla finestra si porrà, a seconda del bisogno, lo strumento da adoperare. Anche se la finestra non è molto grande bisognerà provvedere che, invece di vetri piccoli, essa abbia uno o due vetri ampi. Non facendo così, ed avendo una finestra con vetri piccoli, sostenuti da un telaio composto di parecchi regoli di legno, si andrà incontro all'inconveniente di avere una o più porzioni del telaio proiettato dallo specchio nell'immagine del microscopio, quando si osserva con deboli ingrandimenti, come occorre pur fare molto spesso in embriologia e in morfologia. L'inconveniente è diminuito col sostituire allo specchio piano del microscopio quello concavo. Sarà pure comodo che la vetrata sia formata, invece che da due telai che s'aprono in dentro, da due telai che si muovono verticalmente a *coulisse*, quello superiore scendendo in basso, quell'inferiore salendo sul primo. Con questa disposizione si può, all'occorrenza, avere la metà superiore aperta, senza dover smovere gli oggetti elevati, come le bottiglie, il microscopio, ecc., che si trovano sul tavolo, quando questo è posto subito sotto la finestra; e resta evitata la corrente d'aria in basso, che può essere di disturbo per gli oggetti leggeri che si tengono sul tavolo.

Niente di meglio se invece di un locale si potrà disporre di due; uno per il microscopio e l'altro per il microtomo, e per uso di dissezione. Ma in questo caso i due locali devono comunicare direttamente fra di loro. È assolutamente necessario che il laboratorio sia riscaldato; e, quando ciò è fattibile, sarà da preferirsi un metodo di riscaldamento che non faccia polvere, come fanno i soliti caminetti. Quindi migliore di tutti il riscaldamento a vapore (sistema

KÖRTING ed altri), poi quello con caloriferi. E non potendo aver di meglio bisognerà contentarsi di una stufa o ad antracite o a coke o a legno; nella peggiore ipotesi si ricorrerà ad un braciere coperto, alimentato con carbonella o con sansa di olive. Il riscaldamento è necessario nell'inverno, anche nell'Italia meridionale, perchè non si possono fare sezioni di pezzi imparaffinati se la temperatura del laboratorio non è fra i 15 ed i 20 gradi centigradi. E d'altronde, al disotto dei 12° C., l'osservazione al microscopio viene impedita dal continuo vapore acqueo dell'espiazione e dell'occhio, che si depone sulle lenti.

Per la stessa ragione che si dovrà preferire di avere il laboratorio verso il giardino, piuttosto che verso strada, e che il riscaldamento senza materiali che brucino dentro il locale sarà preferibile a quello fatto colle stufe, per la ragione cioè di diminuire quanto è possibile la polvere, che imbratta e danneggia tutto, si dovrà aver cura nella scelta del materiale che forma l'impiantito del laboratorio. Migliore di tutti quello in legno; se questo non è possibile, si adopriano le piccole mattonelle esagonali a superficie durissima, dette di Marsiglia, oppure quelle ricoperte di maiolica, tanto in uso nell'Italia meridionale. È un impiantito pessimo quello d'asfalto, e l'altro, ancora adoperato nelle vecchie case della Toscana, fatto con mattonelle<sup>1)</sup> di terra cotta. Ma un riparo, poco costoso, si può mettere anche a questo secondo impiantito, continuo generatore di polvere, ricoprendolo con uno stucco ad olio.

Ma la nemica polvere si produce sempre, e per diminuirne la quantità si dovrà esigere la massima accuratezza dal personale di servizio. Non si lasci mai spazzare direttamente con la scopa, ma s'imponga sempre l'obbligo di adoperare la segatura umida, passata lentamente e diligentemente su tutta la superficie del pavimento, ogni mattina. Ed anche la scelta della segatura non è indifferente. Certi legni, come l'abete comune, danno una segatura secca e polverulenta, mentre altri, come l'ormai comunissimo pino resinoso americano (Pitch-pine), danno una segatura morbida, resinosa, adattissima per pulire, anche asciutta, senza far polvere. È pure da notare che la segatura dei segantini è migliore, perchè più grossa, di quella delle segherie a vapore.

Al di fuori dell'uscio del laboratorio si porrà uno stoino, e con apposito avviso si pregherà chi v'entra di pulirsi prima le scarpe. Queste avvertenze non saranno ancora sufficienti, perchè, purtroppo, la polvere penetra ovunque, anche fra una lente e l'altra degli obiettivi, e si dovrà aver l'avvertenza di tenere ricoperti, e di coprire o di riporre ogni sera tutti gli stromenti delicati che si adoperano. Si dovranno avere tutti i ripostigli dei mobili fatti con cura, in modo che la chiusura sia per quanto possibile ermetica.

Un buon metodo è quello di stendere ogni sera sopra il tavolo da lavoro un grande telo, che lo ricopra tutto, con gli oggetti che vi stanno sopra, e che verrà tolto alla mattina, dopo fatta la pulizia e ripiegato con cura, ed ogni tanto sbattuto fuori del laboratorio, e riposto durante il giorno riparato dalla polvere.

Queste precauzioni, assai facili a prendersi, e che d'altronde sono di competenza di un inserviente appena appena mediocre, sembreranno esagerate a taluno; non certo le troverà tali il lavoratore diligente, che mi saprà grado di averglielo rammentate, e che s'accorgerà ben presto del grande vantaggio che si ha dall'osservarle scrupolosamente.

**178. Il mobilio.** — Il mobile più importante del laboratorio d'istologia è il tavolo da lavoro. Se si ha a disposizione una sola stanza con una finestra, il tavolo più economico sarà quello che si costruisce incassando una tavola robusta nel vano stesso della finestra; ma questo è possibile soltanto quando la finestra sia molto bassa, cioè di poco più elevata dell'altezza del tavolo. Se la finestra è alta, bisognerà per forza porre il tavolo ad una certa distanza, ed allora occorre un mobile robusto e pesante, per evitare che si

<sup>1)</sup> *Campigiane* son chiamate propriamente dai muratori fiorentini.

scuotano gli stromenti che vi stanno sopra. E in questo caso conviene la forma a scrittoio, cioè con un vano in mezzo per le gambe, e dei cassetti a destra e a sinistra, e se occorre anche dal lato posteriore del tavolo, cioè verso la finestra. L'altezza da dare al tavolo sarà di circa 80 centimetri, la superficie di esso dovrà essere liscia, senza nessun colore o vernice, perchè questi vengono sempre sciolti da diversi reagenti di uso continuo (alcool, xilolo, benzina, ecc.). Piuttosto converrà, almeno nella parte centrale, mettere una lastra di vetro robusta, incastrata a pari della rimanente superficie del tavolo; e se non si vuole adoprare un vetro liscio, si potrà prendere una di quelle lastre fittamente rigate, così fatta per impedire agli oggetti che vi stanno sopra di scorrere e spostarsi troppo facilmente. Sotto alla lastra di vetro si potranno porre due pezzi di carta, uno nero ed uno bianco, per avere un fondo di colore diverso, e che si presta vantaggiosamente durante certe manipolazioni.

Un tavolo lungo tutta la parete dove sono le finestre, quando queste siano due e abbastanza basse da permetterlo, è pure molto comodo in un laboratorio d'istologia; ed allora il tratto di parete fra le due finestre si presterà per mettervi un piccolo scaffale, che può servire per riporre gli stromenti, oppure i reagenti. E se il laboratorio deve servire per una sola persona, allora davanti ad una finestra si terrà il microscopio, e davanti l'altra il microtomo.

Per osservare al microscopio, se il tavolo è già alto 80 centimetri, bisognerà sedere su d'una sedia piuttosto alta, per arrivare facilmente con l'occhio all'altezza dell'oculare, quando il microscopio non può esserè inclinato. Ma la sedia alta non serve poi per il lavoro ordinario di preparazione, dissezione, ecc., che si deve fare con gli occhi vicini alla superficie del tavolo; ed allora o si può adoprare uno di quelli sgabelli da pianoforte, cioè col piano girevole su di una vite (questa sia di ferro robusta e non di legno), in modo che, sollevandosi un momento e facendo girare il piano con una mano, si può alzare o abbassare a volontà il livello dello sgabello; oppure si terranno due sedie una accanto all'altra e di livello diverso, in modo da servirsi di quella alta, quando si deve osservare al microscopio, e di quella bassa, quando occorre stare vicino al piano del tavolo. Io ho trovato molto opportuna questa modificazione: seduto su di una sedia adatta per vedere bene quello che si fa quando si lavora sul tavolo, se devo servirmi del microscopio, tiro un momento indietro la sedia, apro un cassetto centrale, piuttosto profondo e ben robusto e sicuro nei suoi punti di appoggio, e colloco lo stromento dentro al cassetto, in modo che lo specchio possa raccogliere i raggi luminosi della finestra. Così il microscopio ha la lente oculare ad una altezza cui l'occhio arriva. Quando dello stromento non ho più bisogno, lo rimetto sul tavolo, chiudo il cassetto ed avvicino nuovamente la sedia. Volendo fare le cose con maggior precisione, si potrebbe far costruire, all'altezza opportuna, una tavoletta a *coulisse*, sottostante al piano del tavolo, solidamente assicurata ai due fianchi sui quali scorre, ben robusta e su cui si potrebbe anche fare una tacca corrispondente esattamente alle dimensioni della base del microscopio. Quando questo dev'essere adoprato, si tira fuori la tavoletta a *coulisse* e vi si colloca lo stromento. Finalmente, per adoperare la tavoletta BERNHARD (vedi pag. 12) da disegnare, ho trovato opportuno farmi costruire un tavolinetto di 30 centimetri per 60 di superficie, alto 64 centimetri e fatto con dei robusti pezzi di legno pesante (Pitch-pine). Per la sua piccolezza questo tavolino è facilmente trasportabile e di pochissimo ingombro; io lo tengo solitamente vicino al posto di lavoro con la tavoletta BERNHARD sopra, e quando ne ho bisogno vi metto a posto il microscopio e porto la sedia davanti ad esso per osservare.

Vi sono tanti oggetti da riporre nei diversi cassetti del tavolo (disegni, scartafacci, preparati, ecc.), ch'è necessario avere nel laboratorio altri mobili per tenervi i reagenti, i diversi stromenti, le vetrerie, ecc. Uno scaffale ben chiuso e riparato dai raggi solari servirà per tenere i reagenti che non sono di uso continuo. Un'altra credenza, o mobile simile, potrà servire per riporvi gli utensili, gli stromenti, ecc.

Se il locale ha una sola finestra, col tavolo vicino ad essa, e dietro vi sia il posto per un altro tavolo, allora questo potrà servire per il microtomo, al quale in molti casi è conveniente dare un posto fisso, sebbene questo non sia necessario.

**179. Il gas e l'acqua.** — Nè di questa nè di quello si può far senza in un laboratorio d'istologia. Dove c'è il gas da illuminazione solito bisognerà avere a disposizione due robinetti di presa, ai quali si attaccheranno dei tubi di gomma per avere dove occorrono i bruciatori BUNSEN o la lampada, sia per l'imparaffinamento, sia per riscaldare l'acqua od altre sostanze. Le stesse prese di gas potranno servire, volendo, anche per l'illuminazione serale. Non avendo il gas illuminante, si può ricorrere alla gasolina, che si può fare da sé con poca spesa. Si trovano in commercio apparecchi completi per produrla che costano in tutto 200 lire.

Vari modi sono stati suggeriti per ovviare alla mancanza del gas, ed anche recentemente un nuovo termostato da tenere riscaldato col petrolio venne indicato dal KARAWAIEW <sup>1)</sup>; ma anche con questi espedienti la mancanza del gas si fa sentire troppo di frequente, perchè non si debba insistere sulla necessità di averlo a disposizione nel laboratorio.

Per l'acqua il meglio è di averla, come ormai in gran numero di città, continua e a condotta forzata, in pressione. In un angolo del locale si metterà una piccola piletta di marmo o di ferro smaltato con un tubo di piombo al disotto per lo scarico. A fianco della piletta si porrà una tavoletta di marmo di un quarto di metro quadrato di superficie, e con una scanalatura intorno che permetta di far defluire l'acqua, che vi si versasse sopra, dentro alla piletta. Al disopra di questa arriva il tubo che conduce l'acqua, tubo che porta inferiormente a poca altezza dal livello superiore della piletta un robinetto per regolare il deflusso dell'acqua. Si aggiunge al robinetto il pezzo cilindrico di ottone nell'interno del quale è tesa una reticella pure di ottone; con questo semplicissimo congegno (di costruzione tedesca) il getto d'acqua scende tranquillamente e senza schizzare. Più in alto, un mezzo metro circa sopra il robinetto, il tubo di piombo dovrà portare una derivazione laterale fatta con un tubetto di piombo ed un piccolo robinetto di ottone, il quale venga a corrispondere al disopra della tavoletta di marmo, e quindi a circa mezzo metro di altezza da quest'ultima. Questo secondo robinetto servirà per condurre un piccolo filo d'acqua sui recipienti che in molte occasioni dovranno avere una circolazione continuata per delle ore, od anche per delle giornate, e che saranno collocati sulla tavoletta summenzionata.

Può darsi che non si abbia l'acqua di condotta, ed allora bisognerà ingegnarsi, facendo un recipiente di circa cinquanta litri, che si sospenderà un paio di metri al disopra della piletta. Se si ha la possibilità di metterlo sul pavimento del piano superiore a quello dov'è il laboratorio, niente di meglio; se ciò non è possibile, si dovrà ingegnarsi e costruire un palchetto di legno con due mensole, per reggerlo. Il recipiente può essere di zinco, cilindrico e col coperchio; ma può servire anche benissimo una di quelle damigiane di vetro, provviste in basso di un robinetto, e che si trovano in commercio come vasi vinicoli. In questo secondo caso, il recipiente sarà più difficile a riempire, se non si possiede una pompa per far arrivare l'acqua dentro la damigiana mediante un tubo che s'introduce dalla bocca di essa.

<sup>1)</sup> *Z. wiss. Mikr.*, 13. 1896. p. 172.



## CAPITOLO XVIII.

Il microscopio composto, i suoi accessori  
e gli altri strumenti ottici.

**180. Microscopio composto.** — Il principale strumento per l'istologo è, naturalmente, il microscopio composto. Non credo di dover far qui la teoria ottica di esso, perchè il lettore potrà trovarla in

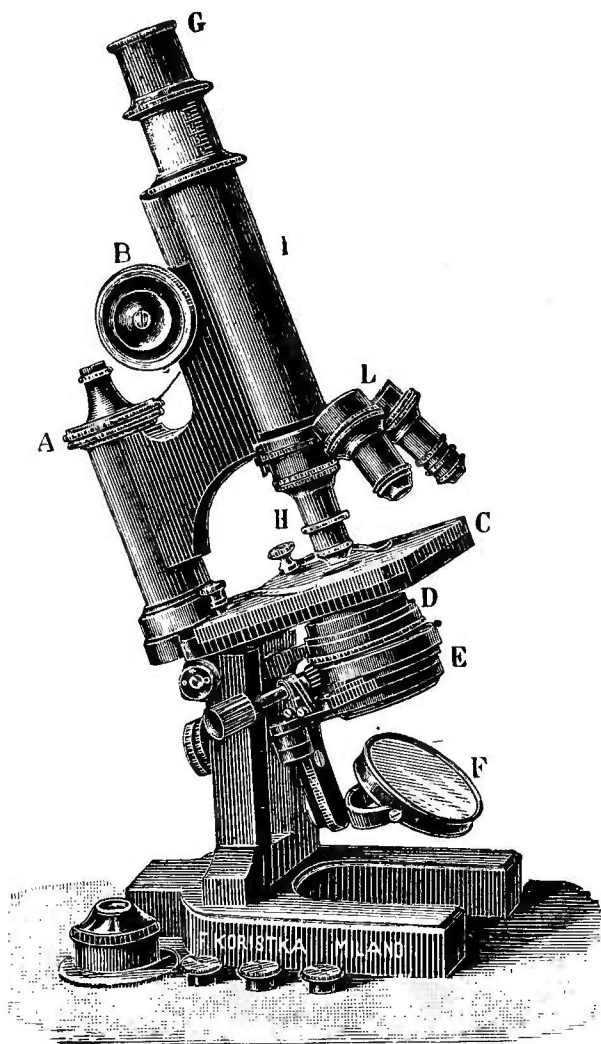


Fig. 34. — Il microscopio composto.

qualunque trattato di fisica. Mi basterà descrivere succintamente le parti che lo comporgono. Sopra un forte basamento di metallo pesante s'appoggia il *tavolino* (fig. 34, C), provvisto nel centro di un foro per il passaggio della luce che viene riflessa dallo *specchio* (F) sottostante. Fra lo specchio ed il tavolino s'inserisce il *porta diaframmi* oppure, in sua vece, l'*apparato ABBE da illuminazione* (E), col *diaframma iride* (D). Nei microscopi moderni, sullo stesso pezzo

che porta l'apparato ABBE, si può sostituire a questo il porta diaframmi.

Sulla parte superiore e posteriore del tavolino s'innalza la colonna contenente la *vite micrometrica* (A), che si regola superiormente con un bottone, ed il pezzo ad essa colonna unito, il quale, mediante una *vite a cremagliera* (B), permette i movimenti rapidi del microscopio propriamente detto. Quest'ultimo consta di un tubo cilindrico (I) che s'allunga o s'accorcia penetrando dentro un cilindro maggiore, l'uno e l'altro anneriti internamente. Le due estremità del cilindro sono aperte, e quella inferiore serve per avvitarsi l'*obiettivo* (H), mentre la superiore riceve internamente, per sfregamento, l'*oculare* (G).

Come sappiamo dall'ottica, l'*obiettivo* dà una immagine reale ingrandita e rovesciata dell'oggetto posto sul tavolino, e questa immagine, che si forma nell'interno del tubo, viene ancora ingrandita, ma non raddrizzata, dalla lente oculare, che sta sulla parte superiore del tubo, ed alla quale si avvicina l'occhio durante l'osservazione.

In tutti i cataloghi dei fabbricanti di microscopi sono elencati e figurati molti modelli di stromenti di prezzo e di forma assai diversi. Qual'è il modello da preferirsi? Questo dipende in parte dalle ricerche che si vogliono fare e dalla somma di cui si può disporre. Per chi si vuol occupare di istologia, e che non deve limitarsi semplicemente ad osservazioni elementari (esame di semenza dei bachi da seta, di fecole alimentari, di fili tessili, ecc.) credo opportuno consigliare un modello piuttosto grande, perchè così si ha un basamento pesante ed un tavolino grande. Ad ogni modo, sempre un modello che, oltre della *vite micrometrica*, sia provvisto anche di quella *a cremagliera* ed asta dentata, per i grandi movimenti.

I fabbricanti di microscopi comprendono nel prezzo del modello (*static* dei Tedeschi) anche quello dell'*armadietto* di mogano, per riporlo. Sarà bene di ricordarsi, nel fare l'ordinazione, di esigere sempre un *armadietto* che permetta di tenervi lo strumento anche quando questo porta gli *obiettivi* sul revolver. Così ogni volta che s'interrompe il lavoro, si può chiudere lo strumento nella sua custodia, senza bisogno di levare gli *obiettivi* ed il revolver; ed oltre a poterlo tenere sotto chiave, lo si ha anche assai più riparato dalla polvere, che non sotto una campana di vetro.

Nelle osservazioni con ingrandimenti molto deboli non occorre, anzi disturba, l'apparato da illuminazione ABBE; ma quando s'impiegano i forti *obiettivi* a secco, e specialmente quelli ad immersione, esso è di grande importanza per non dire indispensabile. Consiglio quindi, nel fare la scelta del modello, di prenderne uno che abbia anche questo accessorio, il quale non può essere adattato ai piccoli modelli.

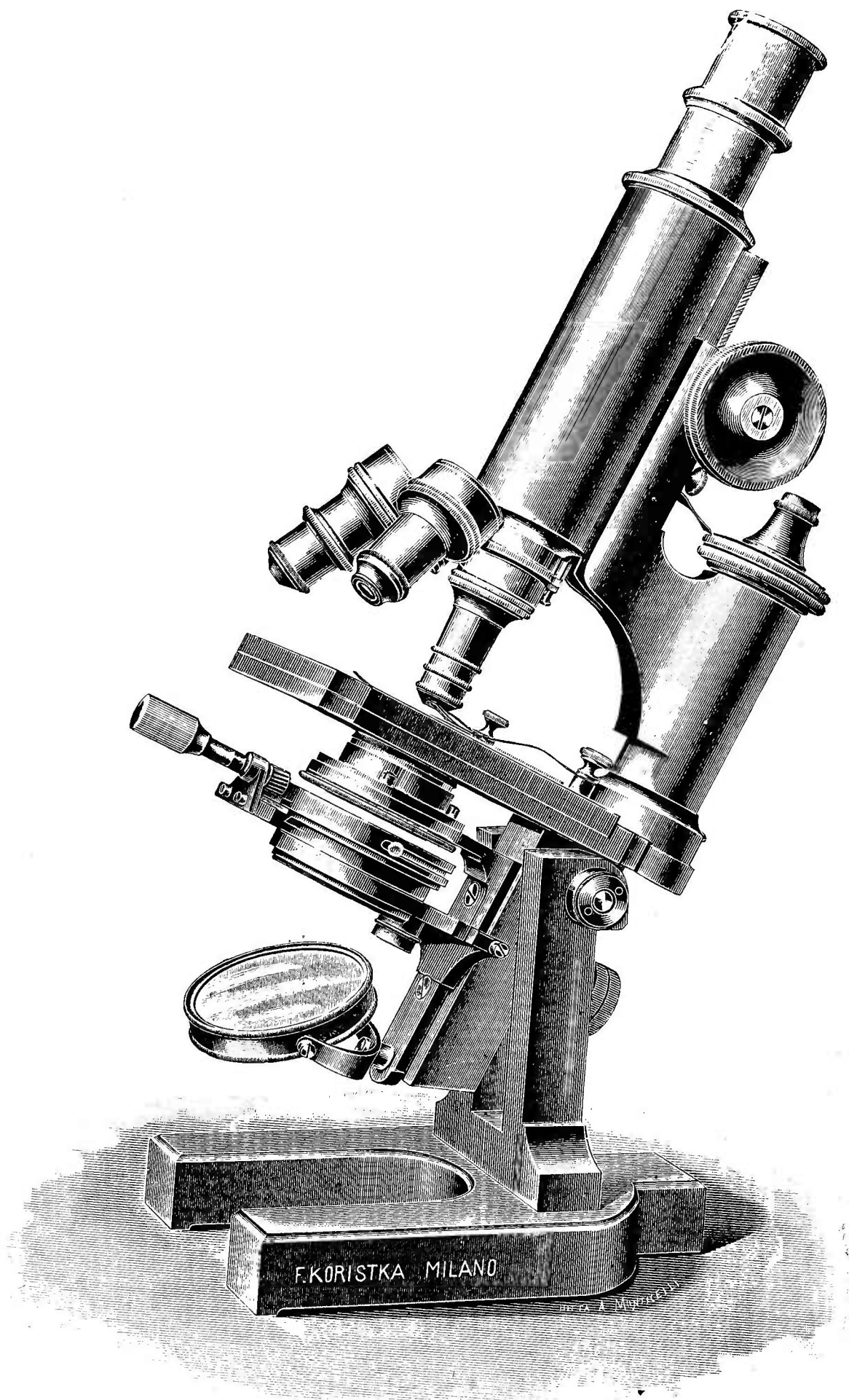


Fig. 35. — Stativo, modello grande III del KORISTKA.

lenti, funzionanti come un grosso condensatore a fuoco breve, e che servono per raccogliere i raggi luminosi, riflessi dallo specchio, e convergerli nel fuoco dell'obiettivo. Sotto al condensatore sta il diaframma iride, provvisto di una grossa asta e di una vite a cremagliera, col mezzo della quale il diaframma si sposta in avanti od indietro, per dare la luce obliqua. Esso può girare intorno al suo asse verticale, e col mezzo della piccola testa a vite (fig. 37) l'apertura dell'iride può essere con tutta facilità cambiata istantaneamente.

Lo specchio del microscopio è doppio; piano da un lato, concavo dall'altro. Per le solite osservazioni serve lo specchio piano,

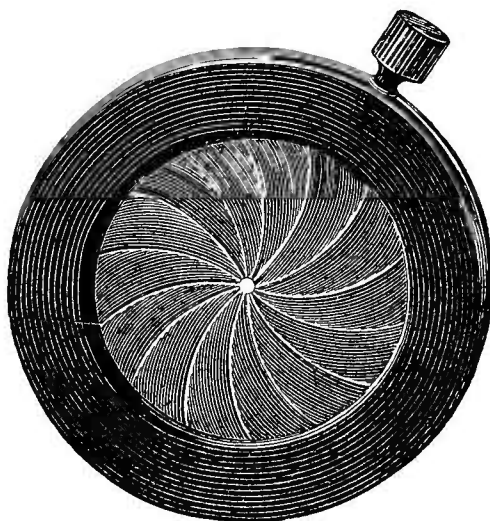


Fig. 37. — Il diaframma iride isolato.

mentre l'altro occorre solo quando si osserva con obiettivi a debolissimo ingrandimento. In tal modo si può sempre lasciare il condensatore a posto.

L'intera apertura del diaframma iride è necessaria quando con fortissimi ingrandimenti si esaminano oggetti molto piccoli e fortemente colorati (nuclei, batteri, ecc.) che spiccano su di un fondo o di colore diverso o scolorato. Nelle solite osservazioni la luce dev'essere moderata, restringendo il diaframma iride, e tanto più quanto più è trasparente il preparato; solo con le piccolissime aperture si vedranno ben netti i contorni degli oggetti.

**181. Oculari e obiettivi.** — Finora ho parlato della parte meccanica del microscopio composto; quella ottica propriamente detta essendo costituita dagli oculari e dagli obiettivi. Il numero di questi che si dovranno acquistare dipende dalla somma che si può spendere e dalle ricerche che si vogliono fare. In generale si può dire che per semplici ricerche d'istologia sono sufficienti tre obiettivi a secco e tre oculari; per le ricerche più delicate, batteriologiche,

citologiche, ecc., bisogna avere anche un buon obiettivo ad immersione ed un paio almeno di oculari compensatori. Solo per osservazioni delicatissime e di controllo si dovrà ricorrere ad un secondo obiettivo ad immersione, provvisto di un più grande angolo d'apertura e che permette l'uso vantaggioso dei più forti oculari compensatori.

Qui è necessaria qualche definizione ed alcune spiegazioni.

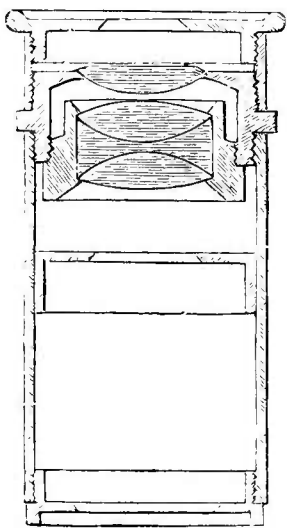


Fig. 38. — Sezione dell'oculare compensatore n. 12. Grand. naturale.

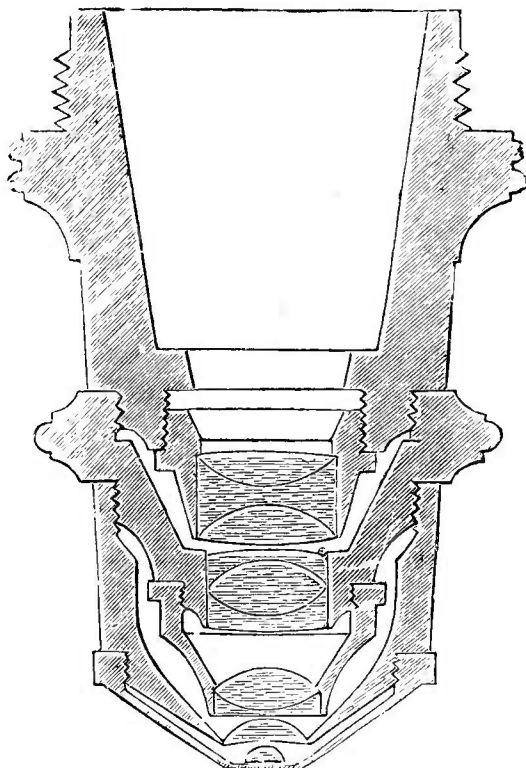


Fig. 39. — Sezione dell'obiettivo apocromatico 2 mm. ad immersione omogenea. Doppio del vero.

L'obiettivo, che s'avvita alla parte inferiore del tubo del microscopio (fig. 39), è formato da un sistema di lenti, l'estrema delle quali, cioè quella che resta esterna ed in basso, è la più piccola di tutte e prende il nome di *lente frontale*, perchè sta appunto di fronte al sottostante preparato.

La *distanza frontale* (da non confondersi con la *distanza focale*) è quella che misura lo spazio libero fra la lente frontale e la superficie superiore del coprioggetti, quando l'obiettivo è in foco, e l'oggetto si trova aderente alla superficie inferiore del coprioggetti e che lo spessore di quest'ultimo è di mm. 0,15.

Tale distanza frontale è notevolissima per gli obiettivi deboli e va sempre diminuendo con l'aumentare della forza degli obiettivi, in modo che, con quelli ad immersione, si riduce a poco più di un decimo di millimetro. Questo è importante ricordare, perchè vuol dire che

coi forti obiettivi (che sono i più costosi ed anche i più delicati) bisogna usare molto riguardo quando si procede a metterli in foco, per non urtare contro il coprioggetti; e che quest'ultimo deve, per quanto possibile, avere uno spessore di mm. 0.15, e ad ogni modo non oltrepassare i mm. 0,25, quando si tratta di quelli grandissimi.

La *distanza focale equivalente* di un obiettivo corrisponde alla distanza che passerebbe dalla superficie di una lente semplice, avente lo stesso ingrandimento dell'obiettivo ed il suo foco. Si tratta dunque di una misura teorica, che non si può controllare praticamente. Quando si conosce la distanza focale, si sa subito anche qual'è l'ingrandimento proprio dell'obiettivo; infatti basta dividere mm. 250 (limite della visione distinta) per il numero che dà la distanza focale per avere in diametri l'ingrandimento dell'obiettivo. Così, per es., se la distanza focale è di 8 mm. l'ingrandimento dell'obiettivo sarà  $250 : 8 = 31$  circa; se la distanza focale è 2 mm. l'ingrandimento sarà  $250 : 2 = 125$ .

Le caratteristiche principali di un obiettivo sono: la distanza focale e l'apertura numerica; della prima abbiamo detto quanto basta: vediamo ora che cosa è la seconda.

**182. L'apertura numerica** è una funzione della massima quantità di luce che un dato obiettivo è capace di ricevere utilmente per la buona formazione dell'immagine ch'esso può dare, ed essa viene espressa dal prodotto dell'indice di rifrazione  $n$  della sostanza che sta fra la lente frontale e il coprioggetti (aria negli obiettivi a secco, acqua in quelli ad immersione ad acqua, olio di cedro, essenza d'anici od altre sostanze in quelli ad immersione omogenea) per il seno della metà dell'angolo  $2u$  del cono di raggi che emanano da un punto dell'oggetto che si esamina e che vengono utilmente raccolti dalla lente frontale dell'obiettivo, per concorrere alla formazione dell'immagine. Calcolando l'angolo  $2u = 180^\circ$  avremo che

$$\text{apert. num.} = n \operatorname{sen} u = n \operatorname{sen} 90^\circ,$$

e siccome  $\operatorname{sen} 90^\circ = 1$ , abbiamo in realtà che l'apertura numerica dell'obiettivo corrisponderà, al massimo, ad  $n$ , cioè all'indice di rifrazione del mezzo che s'interpone fra la frontale ed il coprioggetti. Ora, essendo 1 l'indice di rifrazione dell'aria, 1,33 quello dell'acqua, 1,515 quello dell'olio di legno di cedro (che è poi la *Juniperus virginiana*), ne viene che quelle cifre dovrebbero indicare le rispettive massime aperture numeriche degli obiettivi a secco, ad immersione ad acqua, ad immersione omogenea. In realtà, essendovi delle gravissime difficoltà tecniche nella costruzione degli obiettivi a forte apertura, bisogna limitarsi ad una apertura inferiore a quella che sarebbe teoricamente possibile, e così per gli obiettivi a secco

si arriva appena a 0,90; per quelli ad acqua 1,20; per quelli ad immersione omogenea 1,40.

È chiaro che fra due obiettivi di eguale lunghezza focale, e di diversa apertura numerica, quello che ha l'apertura maggiore dà immagini più chiare e permette una maggiore distinzione di particolari minuti, avrà cioè un maggiore *potere di definizione o di risoluzione* (che è lo stesso) dell'altro. Questo secondo, a minore apertura numerica, darà immagini meno illuminate e meno risolte (o definite), ma avrà un maggiore *potere di penetrazione*, cioè permetterà di distinguere contemporaneamente e nettamente vari piani del preparato, ciò che non si avrà così bene col primo obiettivo.

Riassumendo abbiamo i tre teoremi seguenti dimostrati dall'ABBE:

1.° La chiarezza dell'immagine è (tutte le altre condizioni essendo eguali) proporzionale al quadrato dell'apertura numerica, per un dato ingrandimento;

2.° Il potere risolvete (o deficiente) aumenta e diminuisce con l'apertura numerica;

3.° Il potere di penetrazione è inversamente proporzionale all'apertura numerica<sup>1)</sup>.

È chiaro adesso quale sia il vantaggio degli obiettivi ad immersione, i quali ci danno delle forti aperture numeriche e permettono di interporre fra la lente frontale e il coprioggetti un mezzo il cui indice di rifrazione si avvicina assai a quello del vetro, del balsamo del Canadà e della glicerina, le tre sostanze che chiudono e compenetrano il preparato microscopico (Vedi la tabella degli indici di rifrazione di diverse sostanze, § 114).

**183. Uso degli obiettivi e degli oculari.** — Richiamo l'attenzione dei principianti su quanto sono andato dicendo, perchè ne scaturiscono delle importanti applicazioni pratiche. Prima questa: è un errore, nel quale cadono tutti quelli che non tengono conto delle proprietà ottiche degli obiettivi, credere che più si aumenta l'ingrandimento e meglio si veda nel preparato. Vi deve essere sempre una proporzione fra l'apertura numerica dell'obiettivo e l'oculare adoperato, altrimenti si avrà una immagine molto ingrandita, ma molto oscura, niente affatto risolta o definita. Se io, per es., prendo l'obiettivo 8\* del KORISTKA e l'oculare 2, ho un ingrandimento di 370 diametri, con una buona luce ed un discreto potere risolvete; ma se con quell'obiettivo voglio servirmi dell'oculare 5 avrò bensì un forte ingrandimento (880 d.), ma non distinguerò molto di più, perchè l'apertura numerica limitata (0,88), l'indice di rifrazione diverso fra

<sup>1)</sup> CZAPSKI, *Theorie der optischen Instrumente*, Breslau, 1893.

il mezzo aria (1.00) ed il mezzo vetro + balsamo del Canada (circa 1,5), non mi permettono di avere la chiarezza ed il potere risolvete che sarebbero necessari con siffatto ingrandimento. Se invece prendo il semiapocromatico ad immersione omogenea, che ha 1,30 di apertura numerica, e l'oculare compensatore 6 avrò all'incirca lo stesso ingrandimento (900 d.), ma una chiarezza ed un potere di risoluzione incomparabilmente maggiori.

Bisogna anche aver sempre presente che quando si adoperano i forti obiettivi è opportuno servirsi prima di oculari deboli, e con questi cercare il preparato, od il punto del preparato, che si deve studiare; e dopo che questo si è trovato e messo in fuoco, si potrà sostituire un oculare più forte.

Un errore comune a tutti i principianti è quello di credere che con gli obiettivi molto forti si possano adoperare utilmente i più forti oculari ed arrivare così ai massimi ingrandimenti. Invece anche qui l'apertura numerica limitata limita l'ingrandimento. E, per es., con l'obiettivo semiapocromatico succitato, che ha 1,30 di apertura numerica, si può servirsi con vantaggio dell'oculare 4 (600 d.) e 6 (900 d.), mentre gli oculari più forti daranno dei contorni più grandi, ma non aumenteranno la definizione del preparato. Se assolutamente si sente il bisogno di disporre di maggiori ingrandimenti, occorre possedere l'obiettivo 2 mm. di più larga apertura numerica (1,40), col quale si ha ancora una buona luce ed un buon potere di risoluzione con l'oculare 8 (1000 d.) ed ancora discreto col 12 (1500 d.).

Quando un profano vede un microscopio la domanda che immancabilmente fa è questa: fino a quanto ingrandisce? Invece il micrografo chiederà: che obiettivi avete? e questo non già per sapere l'ingrandimento, ma per misurare dalla risposta il potere risolvete o definente del quale disponete.

Devo ricordare subito che l'obiettivo ad immersione omogenea 2 mm. con l'apert. num. 1,40 è *molto delicato*, e non dev'essere adoperato nelle ricerche usuali, perchè la maggiore apertura numerica è ottenuta mediante una modificazione della montatura della lente frontale, che ne diminuisce di molto la solidità<sup>1)</sup>.

A quali obiettivi si darà la preferenza? Essi si dividono in due

---

<sup>1)</sup> Lo ZEISS era riuscito a costruire un obiettivo ad immersione omogenea con mm. 2,5 di distanza focale e 1,60 di apertura numerica; ma necessariamente questa apertura esigea un mezzo (monobromuro di naftalina) avente un indice di rifrazione assai elevato, occorreva quindi che anche la preparazione fosse conservata nello stesso mezzo; il che non è possibile che per oggetti a secco, come, per esempio, i gusci delle diatomee.



grandi categorie: apocromatici ed acromatici <sup>1)</sup>. I primi introdotti nell'ottica da non molti anni (1886) hanno indiscutibilmente dei vantaggi sui secondi. Ma per il loro maggior prezzo non sono accessibili a tutti. Del resto anche la costruzione di quelli acromatici è di molto migliorata in questi ultimi tempi. Tanto nell'una che nell'altra categoria abbiamo obiettivi a secco ed obiettivi ad immersione omogenea; quelli ad immersione ad acqua sono quasi del tutto fuori di uso. Con gli obiettivi acromatici servono gli oculari comuni, detti anche *Huyghens*; con quelli apocromatici occorrono oculari speciali, detti compensatori. Così chiamati perchè stanno nella parte superiore del tubo del microscopio, in vicinanza dell'occhio, gli oculari agiscono come una semplice lente d'ingrandimento ed hanno lo scopo di far vedere ingrandita un certo numero di volte (fino a 10-12, eccezionalmente fino a 18) l'immagine data dall'obiettivo.

Di solito gli oculari deboli si adoprano con gli obiettivi pure deboli, ma talvolta quando si tratta di oggetti piuttosto grossi e opachi, che non permettono l'uso che dei più deboli obiettivi, torna utile servirsi di oculari forti.

Obiettivi ed oculari danno insieme l'ingrandimento che è notato anche nella tavola qui unita ed essa va intesa sempre per una lunghezza del tubo di 160 mm. Lunghezza misurata dalla distanza che passa dal piano di contatto fra l'obiettivo ed il tubo (sul margine

<sup>1)</sup> Gli obiettivi *acromatici* sono in uso da molto tempo, ed ogni lente di essi è formata da due sorta di cristalli, tenuti uniti col balsamo del Canada. Tuttavia anche questi obiettivi, in seguito agli studi del prof. ABBE di Jena, tanto benemerito della micrografia, furono recentemente migliorati, col modificare in parte la composizione dei cristalli che uniti formano una lente dell'obiettivo.

In quelli *apocromatici* (vedi fig. 39) alcune lenti sono formate, non già da due, ma da tre cristalli diversi, ed uno di questi era un cristallo naturale, lo *spato fluore*, o fluorina, ora sostituito da un vetro di nuova composizione. Anche questi si debbono agli studi del prof. ABBE, e presentano su quelli acromatici il vantaggio di avere realizzate simultaneamente due condizioni relative alla riunione dei raggi dello spettro in uno stesso foco. La prima consiste nella convergenza in uno stesso punto dell'asse di *tre* raggi diversi dello spettro, e così non si ha più lo spettro detto *secondario*, esistente nei soliti obiettivi acromatici. Seconda: la correzione dell'aberrazione di sfericità per *due* raggi di colore diverso, mentre prima la correzione era ottenuta per un solo colore.

Con la realizzazione di quelle due condizioni si sono ottenuti dei vantaggi evidenti. Una concentrazione di luce molto maggiore; una immagine netta non solo nel centro, ma anche alla periferia (ma si ricordi che l'orlo e il centro dell'immagine *non* sono in fuoco esattamente contemporaneamente); la possibilità di usare oculari molto forti, ecco i principali vantaggi degli obiettivi apocromatici.

I soliti oculari impiegati con questi obiettivi darebbero un contorno colorato, e perciò (specialmente per quelli più forti) occorre adoprare oculari appositamente costruiti, detti *oculari compensatori*; i quali del resto possono essere usati con vantaggio anche con gli obiettivi acromatici di grande apertura numerica.

inferiore del tubo) alla lente superiore dell'oculare. Senza bisogno del doppio decimetro, si può precisare la lunghezza di 160 mm. mediante la divisione in millimetri del tubo superiore a sfregamento.

Quando fra la parte inferiore del tubo e l'obiettivo si trova frapposto qualche oggetto, come per es. il *revolver*, lo spessore di questo deve essere compreso nei 160 mm. I modelli più recenti di microscopio sono costruiti in modo che quando portano il revolver la distanza di 160 mm. si ha col tubo superiore tutto chiuso, cioè interamente invaginato in quello inferiore.

Obiettivi ed oculari portano delle notazioni, per indicare la loro forza d'ingrandimento; ma queste notazioni sono arbitrarie, e proprio stupidamente irrazionali negli obiettivi acromatici e negli oculari HUYGHENS. Sono invece razionali e significative negli obiettivi apocromatici e negli oculari compensatori. Questi ultimi portano dei numeri che corrispondono precisamente al numero di diametri d'ingrandimento che danno all'immagine fornita dall'obiettivo; e questo è individuato da un numero che corrisponde alla sua distanza focale equivalente. In quelli ad immersione vi è anche l'indicazione dell'apertura numerica.

L'utilità di una notazione razionale è evidente. Quando si rammenta che la distanza limite della visione distinta (250 mm.) divisa per la distanza focale equivalente dell'obiettivo dà il suo ingrandimento proprio, si comprende, che senza bisogno di avere sott'occhio nessuna tavola, si può, con un calcolo semplicissimo, sapere in un momento quale ingrandimento si ha da un dato sistema ottico. Così, per esempio, con l'obiettivo 4 mm. e l'oculare n. 8, basta fare questo conto:  $250 : 4 = 62,5$ ;  $62,5 \times 8 = 500$  diametri d'ingrandimento, col tubo lungo 160 mm.

Un altro grande vantaggio con questi sistemi lo si ha quando si adopera il *micrometro oculare* per misurare l'immagine. Il micrometro, applicato all'oculare compensatore n. 6, è calcolato in modo che una sua divisione corrisponde esattamente a tanti millesimi di millimetro ( $\mu$ ) quanti sono i mm. di distanza focale dell'obiettivo. Così con l'obiettivo 16 mm. una divisione dell'oculare corrisponde a 16  $\mu$ , con l'obiettivo 4 mm. a 4  $\mu$ , con quello 1,5 mm. a 1,5  $\mu$ , e via di seguito.

Invece negli obiettivi acromatici e negli oculari HUYGHENS abbiamo sempre notazioni arbitrarie, che non significano nulla, e che per colmo di confusione variano da un fabbricante all'altro<sup>1)</sup>.

**184. Scelta dei sistemi ottici.** — Ho già detto che per le comuni

<sup>1)</sup> Vedi pag. 13.

ricerche ritengo sufficienti tre obiettivi e tre oculari; e nella tabella del KORISTKA consiglierai di scegliere:

Obiettivo <b>0</b> (zero), oppure <b>1</b>		
»	<b>3</b>	»
	<b>7*</b>	<b>4</b>
		<b>8*</b>

e gli oculari 2,3 (quello d'uso più generale) e 4.

Per le ricerche d'istologia minuta occorre, come ho già detto, il semiapocromatico ad immersione omogenea, al quale consiglio di aggiungere l'oculare compensatore 6, oltre ai due (4 e 8), forniti con l'obiettivo dal KORISTKA.

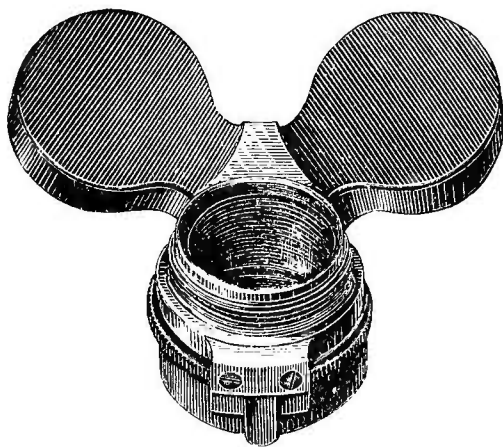


Fig. 40. — Revolver per tre obiettivi.

Chi potesse spendere di più e desiderasse avere gli obiettivi apocromatici dovrebbe acquistare i quattro a secco (16, 8, 4 e 3 mm.) e quello 2 mm. 1.30 d'apert. num. ad immersione omogenea. Oculari comp. 2, 4, 6, 8, 12, 18. Per le difficili ricerche si può prendere uno dei due obiettivi di 1.40 d'apertura numerica, con l'avvertenza che quello di 2 mm. di distanza focale è molto delicato e di breve distanza frontale, in confronto di quello 3 mm.

Lo ZEISS da qualche tempo costruisce un obiettivo D\*, per ingrandimenti da 200 a 500 diametri, utilissimo nell'osservazione di animali viventi in un liquido. Ha una grande distanza focale (più di 4 mm.) ed è molto penetrante. L'obiettivo è ad immersione ad acqua, e può essere adoperato anche senza coprioggetti e con l'acqua di mare. Costa 94 franchi in oro.

**185. Revolver.** — Un accessorio del microscopio, al quale ho già accennato, consiste nel *revolver*, che risparmia la grave perdita di tempo che si avrebbe quando, per cambiare l'obiettivo e sostituirne un altro, si dovesse svitarli ed avvitarli volta per volta sul tubo del microscopio.

Come si vede dalla fig. 40, il porta obiettivo a revolver triplo è così fatto che si avvita al tubo del microscopio e porta avvitati tre obiettivi, i quali possono essere sostituiti nell'osservazione uno all'altro con tutta facilità.

**186. Il micrometro oculare** è un altro accessorio importante. Si applica all'oculare 2 HUYGHENS (il quale costa allora L. 18) e al 6 compensatore (L. 30). È un disco di vetro che porta segnati 10 mm.

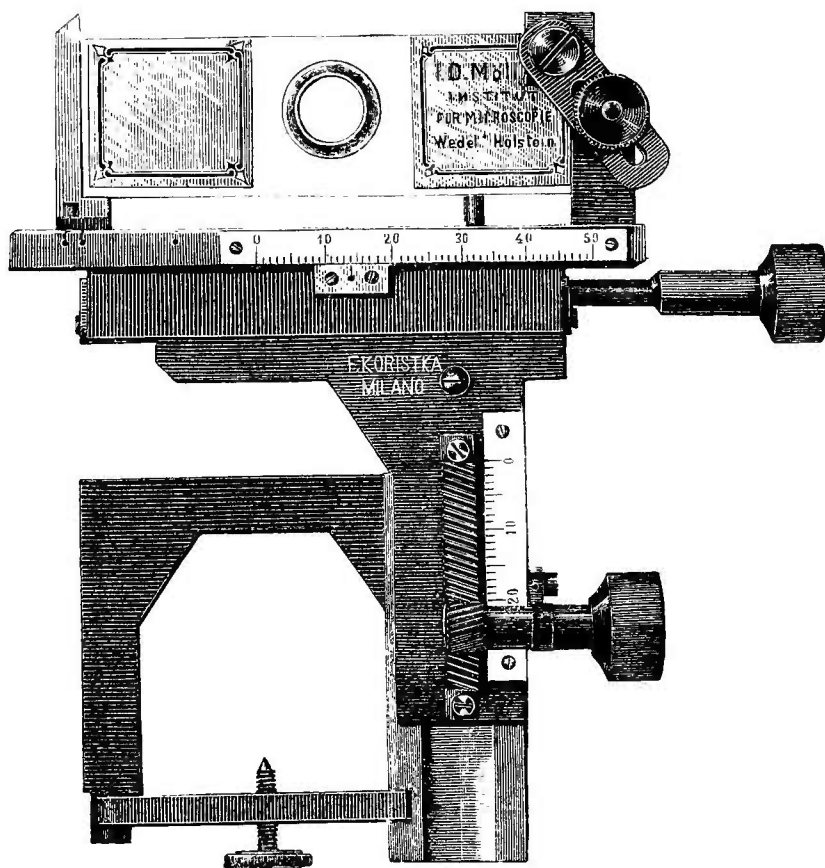


Fig. 41. — Tavolino traslatore, da applicarsi ai grandi modelli.

divisi in 100 parti. Nei sistemi acromatici il valore di ognuna di queste divisioni coi diversi obiettivi è dato da una tabella che viene fornita dal costruttore. Ho già detto che con gli apocromatici ogni divisione del micrometro corrisponde a tanti  $\mu$  quanti sono i mm. di distanza focale dell'obiettivo apocromatico.

Accessori, non di uso comune, ma in molte ricerche assai vantaggiosi, sono :

**187. Il tavolino traslatore**; s'adatta solo ai modelli grandi, e permette due movimenti, fra loro ortogonali, al portaoggetti. Due scale, divise in millimetri danno la posizione del portaoggetti e servono a ritrovare un dato punto del preparato. Col nonio si può stimare un decimo di millimetro. Questo tavolino traslatore costa, dal KORISTKA, lire 80.

**188. Apparecchio per la luce polarizzata**, necessario quando si debbano fare degli studi sui muscoli striati dei vertebrati e degli invertebrati. Consta

di due parti: il nicol, o polarizzatore, che s'introduce nel diaframma ad iride dell'apparato Abbe; e il prisma nicol o analizzatore che si mette dalla parte dell'oculare. Il prezzo dell'apparecchio completo varia dalle 50 alle 70 lire.

**189. Tavolino riscaldabile**, modello LÖWIT; si adopera quando si devono osservare al microscopio degli oggetti ad una temperatura determinata. Il riscaldamento vien fatto con una corrente d'acqua calda. L'apparecchio, fornito del termometro e del condensatore, costa lire 50.

**190. Il micrometro per l'obiettivo** consta di due millimetri divisi in 200 parti, con numeri ad ogni 10 divisioni, segnati su di un portaoggetti formato inglese; costa lire 12.

**191. Micrometro oculare a rete.** — È un quadrato di mm. 10 di lato, diviso in 100 quadrati; un lato è marcato con lettere, l'altro con numeri ad ogni divisione. È comodo quando si debbano contare oggetti piccoli e numerosi sparsi nel campo del microscopio; costa lire 6.

**192. Contaglobuli Thoma.** — Formato da una camera di vetro esattamente calibrata, profonda 0,1 mm. e con incisa una rete di 400 campi su di un millimetro quadrato; ha dei coprioggetti perfettamente piani ed una pipetta calibrata per la diluizione del sangue nel rapporto di 1 a 100. Costa lire 35.

**193. Illuminatore verticale.** — Nel suo ultimo catalogo (1898) lo ZEISS ha aggiunto un nuovo accessorio, che può essere di giovamento nelle ricerche zoologiche, e che serve per rischiarare gli oggetti opachi. L'illuminatore verticale (fig. 42) si pone fra l'obiettivo e il tubo. Un'apertura fatta nel pezzo *R* lascia passare la luce, che arriva sul prisma riflettore *p*, il quale copre circa la metà dell'apertura dell'obiettivo. I raggi luminosi subiscono una riflessione totale e sono portati dal prisma ad una metà dell'obiettivo, che li concentra sul preparato. L'immagine si forma passando per l'altra metà dell'obiettivo, ed è, come al solito, raccolta dall'oculare.

Il pezzo che porta il prisma ruota (con l'obiettivo) sull'asse ottico, e così si può dare ai raggi incidenti la direzione più opportuna. Inoltre, col mezzo del bottone *K*, si può girare il prisma *p* su di un'asse orizzontale, per regolare precisamente l'inclinazione, dopo che si è già dato ai raggi incidenti una direzione approssimativamente esatta, sia inclinando la parte superiore del microscopio, sia spostando verticalmente la sorgente luminosa.

Questa può esser data o da un lume o dai raggi solari raccolti con un eliostato. Il prezzo dell'illuminatore è di lire 22,50 in oro.

**194.** Sebbene non si possa chiamare veramente un accessorio del microscopio, è il caso di menzionare qui la *camera chiara per disegnare*, che ho già descritta altrove (pag. 9).

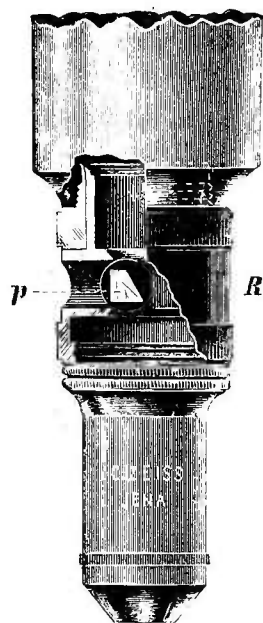


Fig. 42. — Illuminatore verticale, in A avvitato al tubo e con un obiettivo. in B visto dall'alto;  $\frac{2}{3}$  della grandezza naturale.

**195.** Un altro apparecchio, che non è certamente necessario, ma che è molto comodo, non solo per disegnare, ma anche per prendere degli appunti, mentre si sta osservando al microscopio, è il tavolino per disegnare del BERNHARD. Costa 52 franchi in oro; vedi la figura a pag. 12.

**196. Come si conserva il microscopio.** — Il microscopio composto verrà riposto ogni volta nel suo armadietto, e se si ha tenuto conto dell'avvertenza data (vedi pag. 154), non ci sarà bisogno, per far questo, di levare nè gli obiettivi, nè il revolver. Anche l'oculare che sta sul tubo dev'essere lasciato a posto, perchè altrimenti la polvere scendendo giù per il tubo potrebbe penetrare nel sottostante obiettivo. Non avendo l'armadietto verticale, ma una delle vecchie cassette orizzontali, il microscopio sarà tenuto sotto una campana di vetro, con l'avvertenza che l'orlo inferiore di questa sia bene a contatto col piano del tavolo su cui posa, per lasciar passare la minor quantità di polvere possibile. Gli oculari che bisogna avere alla mano saranno tenuti in una piccola scatola di cartone rivestita di tela nera, che di solito vien fornita dal fabbricante. Gli obiettivi che non sono avvitati sul revolver saranno lasciati chiusi nei cilindri di ottone col coperchio a vite, come quando vengono dalla fabbrica. Se si deve stare parecchio tempo senza servirsi dello stromento, sarà meglio levare gli obiettivi dal revolver e riporli tutti nelle loro custodie metalliche. Dovendo lasciare per qualche minuto l'obiettivo isolato sul tavolo lo si poserà capovolto, cioè colla lente frontale in alto; avvertendo che la superficie sulla quale posa sia ben netta.

Un difetto comune a molti è quello di prendere il microscopio (ogni qualvolta si debba sollevarlo, per portarlo da un posto all'altro) con una mano al disopra del tavolino, precisamente nel tratto dove si stacca dalla colonna della vite micrometrica il pezzo che regge la vite a cremagliera. In questo modo tutto il peso del piedistallo viene sopportato dalla molla della vite micrometrica, che finirà con l'allentarsi. Bisogna avere dunque l'avvertenza di prenderlo in modo che mentre l'indice abbraccia la colonna della vite micrometrica, subito al disopra del tavolino, il medio regga al disotto di questo il peso del piedistallo; il pollice ainterà le due dita e così lo stromento viene sollevato senza danno.

La parte metallica del microscopio verrà ogni tanto ripulita con uno straccio ben terso e netto, oppure con una pelle di Dante. Le lenti dell'oculare e quella frontale dell'obiettivo saranno ripulite sempre con dei piccoli pezzi di vecchia tela, e mai con altre sostanze; avvertendo di tenere detti pezzi riparati dalla polvere. Le lenti dell'oculare saranno smontate quando ci sia la certezza che del sudicio è penetrato nell'interno; nel tornare ad avvitare si osservi di far coincidere i punti segnati dal fabbricante. Le lenti dell'obiettivo è molto meglio di non smontarle mai. Nel pulire la lente frontale

si facciano sempre dei movimenti rotatori, per evitare il pericolo delle rigature trasversali. Se la lente frontale è sporca, si bagni con acqua distillata il pezzetto di tela; se è sporca di resina (balsamo del Canada, ecc.), si inumidisca il cencio con xilolo e si asciughi rapidamente, tenendo poco tempo la frontale a contatto col xilolo, per esser certi che il liquido non penetra nell'obiettivo. Se questo succede potrebbe venirne danno, perchè i diversi cristalli che compongono ogni singola lente sono tenuti insieme col balsamo del Canada.

Se, dopo fatta la pulitura, l'obiettivo rimane opaco, bisogna spedirlo al fabbricante; molto meglio far così che non esporsi al rischio di aumentare il guasto.

Non si adoperi l'alcool, specialmente se forte, per ripulire le parti metalliche del microscopio, perchè la vernice gialla è solubile nello spirito.

L'obiettivo ad immersione sarà adoperato con molti riguardi. Prima di metterlo in fuoco si dovrà esaminare la preparazione con un debole obiettivo; per assicurarsi che il punto da osservare si trova nell'asse ottico; poi si sostituisce all'oculare ordinario quello compensatore (di solito il 4), si alza il tubo del microscopio e si pone una goccia di olio di legno cedro denso sul coprioggetti, poi si abbassa il tubo e, sporgendo il capo da un lato, si osserva quando la frontale tocca la goccia d'olio; allora si torna a mettere l'occhio sull'oculare e, col diaframma iride, poco aperto, si fa scendere *lentamente* il tubo con la vite a cremagliera; appena s'intravede la preparazione, si abbandona questa vite, tenendo sempre l'occhio sull'oculare, per prendere quella micrometrica, e scendendo lentamente (cioè girando nel senso della lancetta di un orologio la testa della vite) si arriva al fuoco preciso. Se l'osservazione viene sospesa per breve tempo, si può lasciare tutto a posto, ma, se si tratta di una interruzione di qualche ora, si tirerà su il tubo, si asciugherà con un pezzo di tela vecchia ben pulito la frontale dall'olio di cedro, e si riporrà l'obiettivo. Basta asciugare semplicemente, senza inumidire la tela con xilolo; nel caso che questo fosse necessario rammentare l'istruzione già data.

Gli oculari compensatori più forti, dal 6 in su, si adoperano solo dopo che si è andati in foco con il 2 o il 4.

Il microscopio sarà tenuto lontano dalle sorgenti di calore e dai vapori acidi. Gli obiettivi più costosi sono i più delicati e con una temperatura di oltre 40° C., nell'aria umida possono guastarsi.

**197. Altri strumenti ottici.** — Se il microscopio composto è senza nessun dubbio lo strumento ottico essenziale per il micrografo, non è il solo; ed altri sono necessari per preparare il materiale stesso che poi dovrà servire per fare i preparati microscopici. Così, per

esempio, occorre talvolta cercare ed isolare nell'interno del corpo di un animale, magari di piccole dimensioni, un organo; fare una dissociazione, separare l'uno dall'altro dei piccoli organismi, fare delle

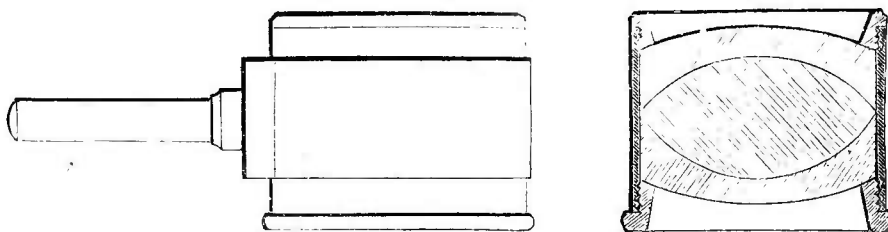


Fig. 43. — Lente aplanatica perfezionata; a destra è vista in sezione. Grandezza naturale.

sottili iniezioni, ecc. Ora tutto ciò non si può eseguire comodamente col microscopio composto, perchè la lunghezza del tubo obbliga a tenere gli occhi assai distanti dalla preparazione; la posizione delle

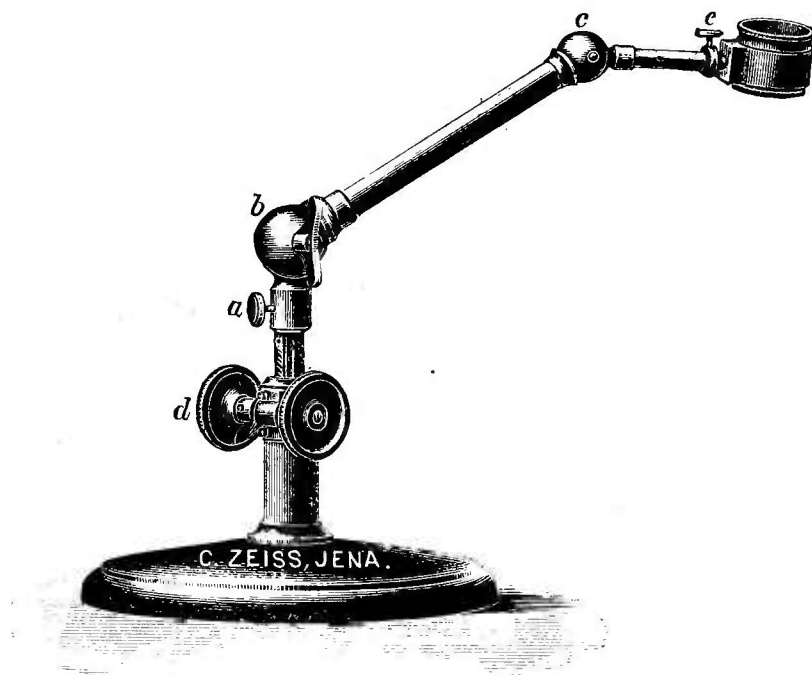


Fig. 44. — Sostegno snodato, con lente aplanatica.  $\frac{1}{3}$  della grandezza naturale.

mani è scomoda, se si devono tenere dei ferri da dissezione, ecc. Anche l'essere, nel microscopio composto, l'immagine rovesciata costituisce una grave difficoltà pratica, per quanto con un prisma raddrizzatore, che si applica all'oculare, si possa avere l'immagine dritta.'

Quando occorrono un debole ingrandimento e un fòco lungo, si adopererà con vantaggio una *lente aplanatica* (fig. 43), o, meglio ancora, una *lente BRÜCKE*, tenuta su di un sostegno snodato (fig. 44). Una buona lente aplanatica costa L. 18; una di BRÜCKE, con obiettivo



ed oculare, 12 lire (fig. 45). Un sostegno porta lenti snodato, L. 32. Ma le lenti semplici e quella BRÜCKE non danno che dei deboli ingrandimenti; occorre poi, talvolta, nelle dissezioni, oltre ad un ingrandimento più forte, la luce incidente, cioè riflessa da uno specchio. In questo caso se, per le ragioni dette prima, l'uso del microscopio composto è difficile, bisogna acquistare il *microscopio semplice* del MAYER. La figura 46 fa vedere chiaramente la forma.

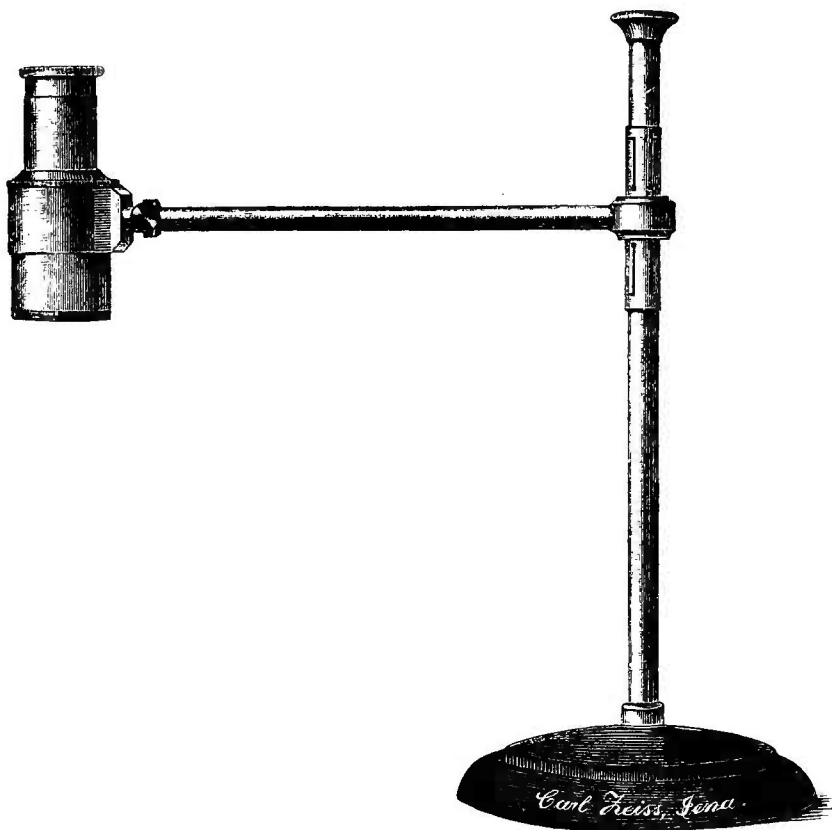


Fig. 45. — Lente BRÜCKE con sostegno semplice.  $\frac{1}{3}$  della grandezza naturale.

dello stromento, che sul fianco destro porta anche l'appoggiamani. A sinistra, naturalmente, si mette un altro pezzo analogo, che manca nella figura. In A si fa il movimento quando si vuol sostituire al vetro C uno dei diaframmi opachi (bianco e nero), che si scorgono a sinistra. Costa L. 125, senza le lenti relative. Queste ultime sono costituite da una lente aplanatica, per i deboli ingrandimenti, e dal sistema detto a cannocchiale Galileiano, e che ingrandisce fino a 100 diametri. Con un piccolo cambiamento al braccio porta lenti si può applicare anche la lente BRÜCKE; consiglio questa modificazione, perchè molto utile quando occorre un discreto ingrandimento ed una distanza focale rilevante.

**198. Microscopio binoculare di Greenough con sostegno mobile in tutte le direzioni, secondo Braus e Druener.** — A chi può spendere raccomando caldamente questo bellissimo sistema ottico, che pre-

senta grandi vantaggi. Lo stromento (fig. 47) è a visione binoculare stereoscopica, ottenuta con due microscopi completi, provvisti di obiettivo ed oculare, diretti simultaneamente sullo stesso punto dell'oggetto. L'immagine viene raddrizzata da un prisma del PORRO,

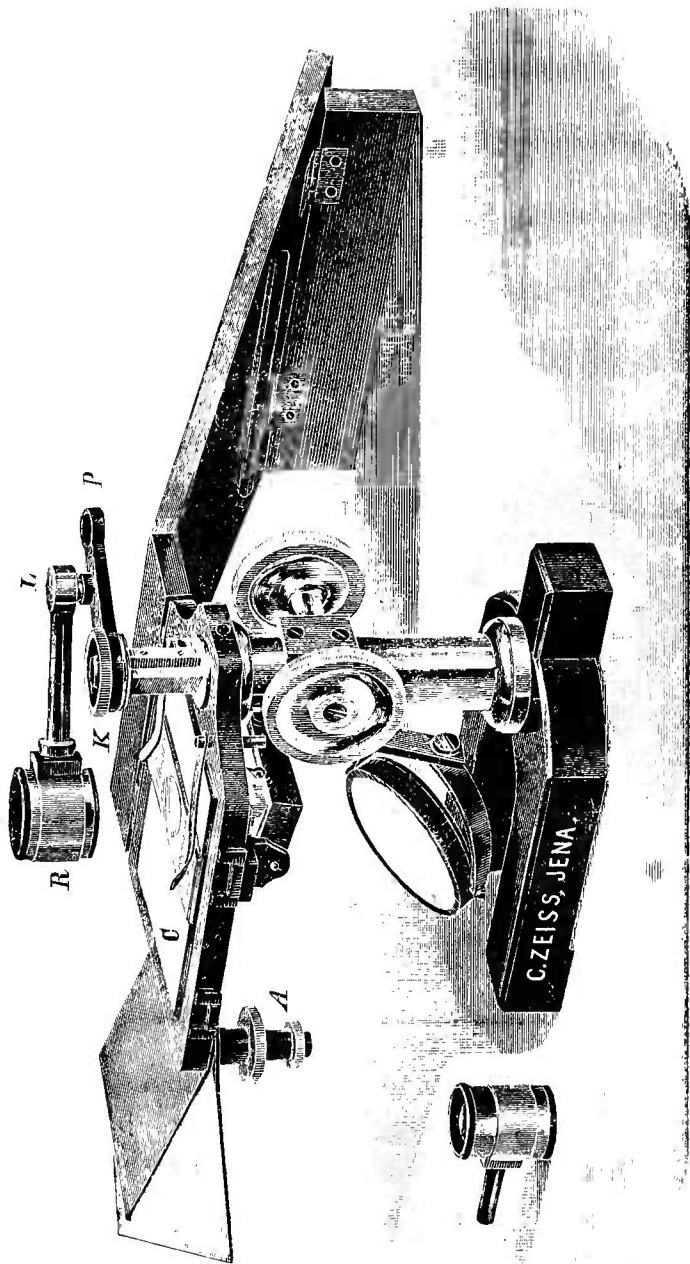


Fig. 46. — Microscopio semplice del MAYER.  $\frac{1}{3}$  della grandezza naturale.

e la distanza fra i due oculari si varia a volontà, per adattarla a quella delle pupille dell'osservatore. Vi sono quattro paia di oculari ed uno di obiettivi; si ottengono così ingrandimenti da 20 a 50 diametri con una buona distanza focale ed un campo abbastanza ampio.

Come microscopio da dissezione, esso è utilissimo, perchè, oltre

al grande vantaggio della visione stereoscopica, permette l'osservazione di oggetti voluminosi, anche se immersi in un liquido. La lunghezza del tubo fa sì che la testa ed il corpo dell'osservatore rimangano in una posizione comoda, in confronto di quando si adopera uno dei soliti sistemi da dissezione. Questa distanza rende possibile anche l'osservazione prolungata di oggetti immersi nella formalina o nell'acido osmico, senza danno della mucosa nasale o delle congiuntive.

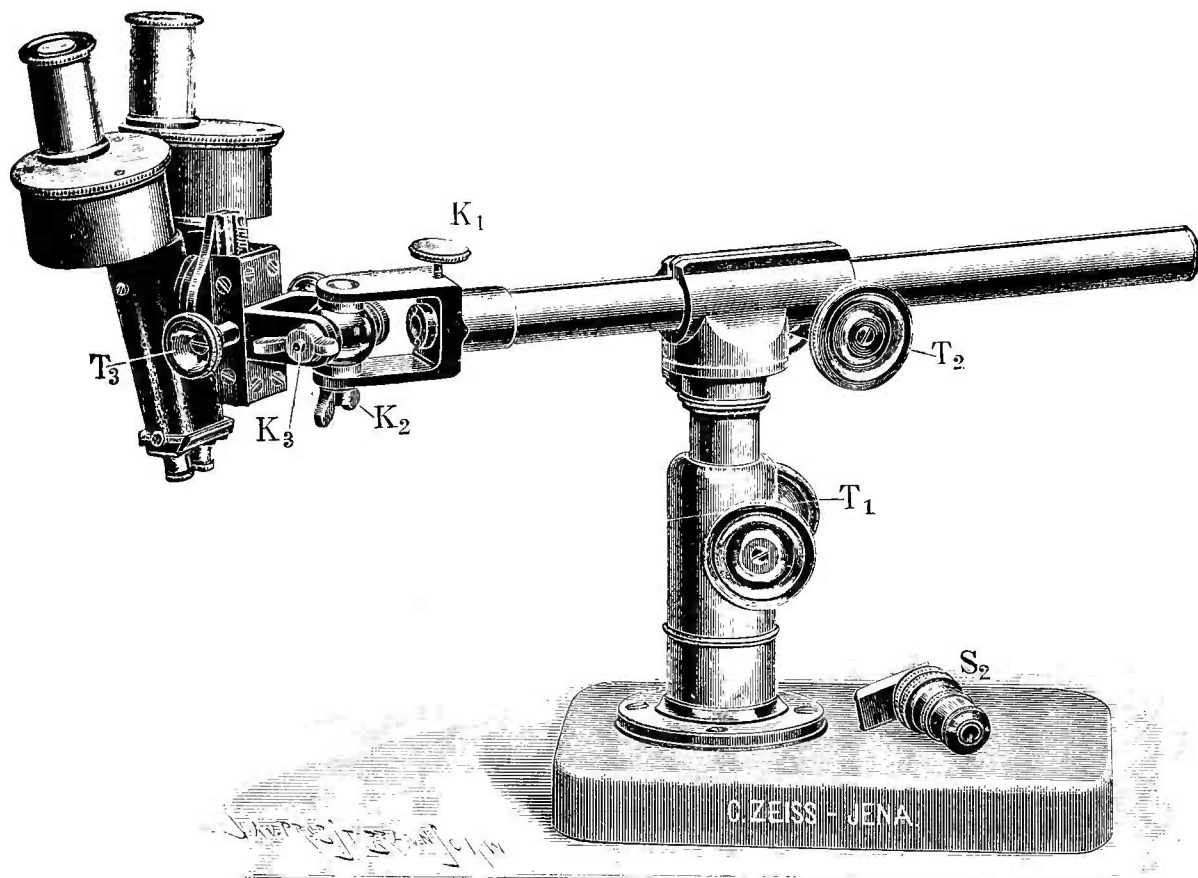


Fig. 47. — Microscopio binoculare da dissezione secondo GREENONGH, e con sostegno mobile in tutte le direzioni, di BRAUS e DRÜNER.  $\frac{1}{4}$  della grand. nat.

Il microscopio si adatta anche per la visione monoculare con un forte obiettivo ( $S_2$ ).

Il sostegno è fatto in modo che il microscopio può girare in tutte le posizioni. Con le viti a cremagliera  $T_1$   $T_3$  si fanno gli spostamenti verticali, con la  $T_2$  quelli orizzontali. Con la sospensione cardanica regolata dalle viti  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  si può far ruotare lo strumento come si vuole.

Si può così esaminare un oggetto voluminoso ed irregolare, come si può osservare comodamente dentro un acquario di vetro, ed anche esplorarne il fondo dal disotto.

Il prezzo dello strumento, costruito dallo ZEISS, con un paio di obiettivi ed un solo paio di oculari è di lire 425 in oro.

199. Tabella degli obiettivi acromatici e degli oculari Huyghens, secondo F. Koristka di Milano.

Denominazione dell'obiettivo	Apertura numerica	Distanza focale equivalente	Distanza frontale in mm. <sup>1)</sup>	Ingrandimento proprio dell'obiettivo <sup>1)</sup>	Ingrandimento con gli oculari Huyghens; tubo lungo 160 mm. e 250 mm. di visuale					Prezzo degli obiettivi in lire	OSSERVAZIONI
					Oculare 1	Oculare 2	Oculare 3	Oculare 4	Oculare 5		
a		40	38	6	9	11	16	22	—	12	L'oculare 1 ingrandisce 3 volte.
b		30	28	8	22	27	36	48	—	12	2
c		25	23	10	28	34	42	60	—	12	3
0	0.12	36	33	7	17	21	27	35	—	30	4
1	0.15	25	19.6	10	27	34	42	58	—	30	5
2	0.20	18	8.5	14	42	52	67	90	—	30	7
3	0.28	15	5.2	16.6	52	65	85	115	—	30	9,25
4	0.44	11	1.95	22.7	70	90	115	150	—	35	Il prezzo di ogni oculare è di L. 9.
5	0.60	7.5	1.20	33.3	110	135	175	240	220	40	*) L'asterisco indica la maggiore apertura numerica.
6	0.72	4.7	0.75	53.2	160	215	265	370	325	40	—
7	0.70	3.8	0.5	65.8	215	275	350	480	490	40	1) Valori approssimativi.
7*	0.85	3.8	0.3	65.8	215	275	350	480	670	40	2) 65 con la montatura a correzione.
8	0.75	2.8	0.3	89.3	295	370	475	620	880	45	2) 75
8*	0.88	2.8	0.25	89.3	295	370	475	620	880	55	2) 85
9*	0.88	2.1	0.2	119	410	510	660	900	1260	65	3) Ad immersione omogenea.
1"/12 <sup>3)</sup>	1.30	2.1	0.2	119	410	510	660	900	1260	130	
1"/15 <sup>3)</sup>	1.30	1.7	0.18	147	600	900	1200	1800	2700	200	Ad immersione omogenea; nelle 200 lire è compreso il costo dei due oculari compensatori 4 e 8.

**200. Tabella degli obiettivi apocromatici e degli oculari compensatori.**

I prezzi sono quelli del catalogo KORISTKA di Milano.

OBIETTIVI Lunghezza focale equivalente	Apertura nu- merica	Distanza frontale in mm.	Ingrandi- mento dell'o- biettivo solo	Ingrandimento con gli oculari compensatori; tubo lungo 160 mm. e 250 mm. di visuale					Diametro del campo in mm.	Prezzi di Koristka Lire
				2	4	6	8	12		
16 mm. a secco	0.80	5	15.5	31	62	94	125	187	281	10
8 »	0.65	1	31	62	125	187	250	375	562	120
4	0.95	0.2	63	125	250	372	500	750	1125	160
3	0.95	0.15	83	167	333	498	667	1000	1500	160
3 mm. Immersione omogenea	1.30	0.16	83	167	333	498	667	1000	1500	300
3	1.40	0.16	83	167	333	498	667	1000	1500	400
2 »	1.30	0.14	125	250	500	750	1000	1500	2250	300
2 »	1.40	0.14	125	250	500	750	1000	1500	2250	400
1.5 »	1.30	0.09	167	333	667	1000	1334	2000	3000	300

**NB.** — L'ingrandimento proprio dell'obiettivo si ottiene dividendo 250 mm. (distanza della visione distinta) per la lunghezza focale equivalente.

I numeri degli oculari compensatori indicano esattamente il numero di volte per il quale si deve moltiplicare l'ingrandimento proprio dell'obiettivo per avere l'ingrandimento dato dal sistema.

Il diametro del campo è dato per l'oculare compensatore 4. Gli oculari compensatori costano L. 20 (4, 6, 8) e L. 30 (12, 18) ciascuno.

## CAPITOLO XIX.

## Materiale necessario nel laboratorio.

Oltre al microscopio composto e a quello semplice da dissezione, al microtomo e ai vetri porta e coprioggetti, dei quali tutti è detto particolarmente nei capitoli XVI e XVIII, occorrono in un laboratorio d'istologia gran numero di altri piccoli stromenti, oggetti di vetro, ecc. Vediamo di passarli in rivista possibilmente tutti.

**201. Bilancia.** — Non se ne può fare a meno, perchè è continuo il bisogno di fare delle piccole pesate con una certa esattezza. Basta una di quelle piccole bilancie da farmacisti, che dovrà essere tenuta riparata dentro una custodia. Con 30 lire se ne potrà avere una di discreta, ed altre 20 o 25 lire bisognerà spendere per una buona pesiera (i pesi maggiori dorati, quelli piccoli da  $\frac{1}{2}$  g. in giù di alluminio o di metallo nichelato). Quest'ultima è necessaria per poter fare delle pesate abbastanza precise.

**202. Recipienti graduati.** — Occorrono per misurare i liquidi; sono di vetro o di cristallo e delle forme più diverse. Sono molto comodi i vasi cilindrici graduati, in centimetri cubici; e se ne dovranno prendere alcuni piccoli da 10 cc., da 50, da 100, uno da 200 e un altro da 500 cc. Servono bene anche dei matracci calibrati da 10, 20, 50, 100 cc. e un paio di calici pure graduati, uno da 20 e l'altro da 50 cc. Per piccoli volumi vedi la tabella (cap. XX), dove è dato approssimativamente in gocce il centimetro cubico e così pure il peso di un grammo.

Un alcoolometro di GAY LUSSAC occorre per poter misurare la forza dell'alcool.

**203. Termostato.** — Non è necessario per l'istologo, ma molto comodo quando si voglia tenere lungo tempo un oggetto molto voluminoso, o molte preparazioni, ad una temperatura determinata. Il batteriologo non può farne a meno, anzi ne dovrà avere più di uno.

Vi sono moltissimi modelli di termostati. Essi consistono di una cassetta a doppia parete con due sportelli nella parte anteriore, e con delle divisioni all'interno; il tutto di metallo, rivestito esternamente, meno che nella superficie inferiore, di una sostanza coibente (feltro, amianto, ecc.). Nello spazio che rimane fra la parete interna e quella esterna si mette dell'acqua che si riscalda con una fiamma, messa sotto alla superficie inferiore. Il termostato è sostenuto da un panchetto di ferro con 4 gambe e porta superiormente dei fori per il passaggio del termometro (che deve penetrare nello spazio interno), del regolatore della temperatura, che penetra nell'acqua fra le due

pareti, e di un'apertura per introdurre l'acqua. Spesso porta di fianco un livello d'acqua e un rubinetto di scarico.

**204. Stufa per imparaffinare.** — Quando si possieda il termostato od anche una delle solite stufette di rame (modello GAY LUSSAC), la migliore stufa da paraffina è quella del MAYER, conosciuta sotto il nome di modello Stazione zoologica di Napoli (fig. 48).

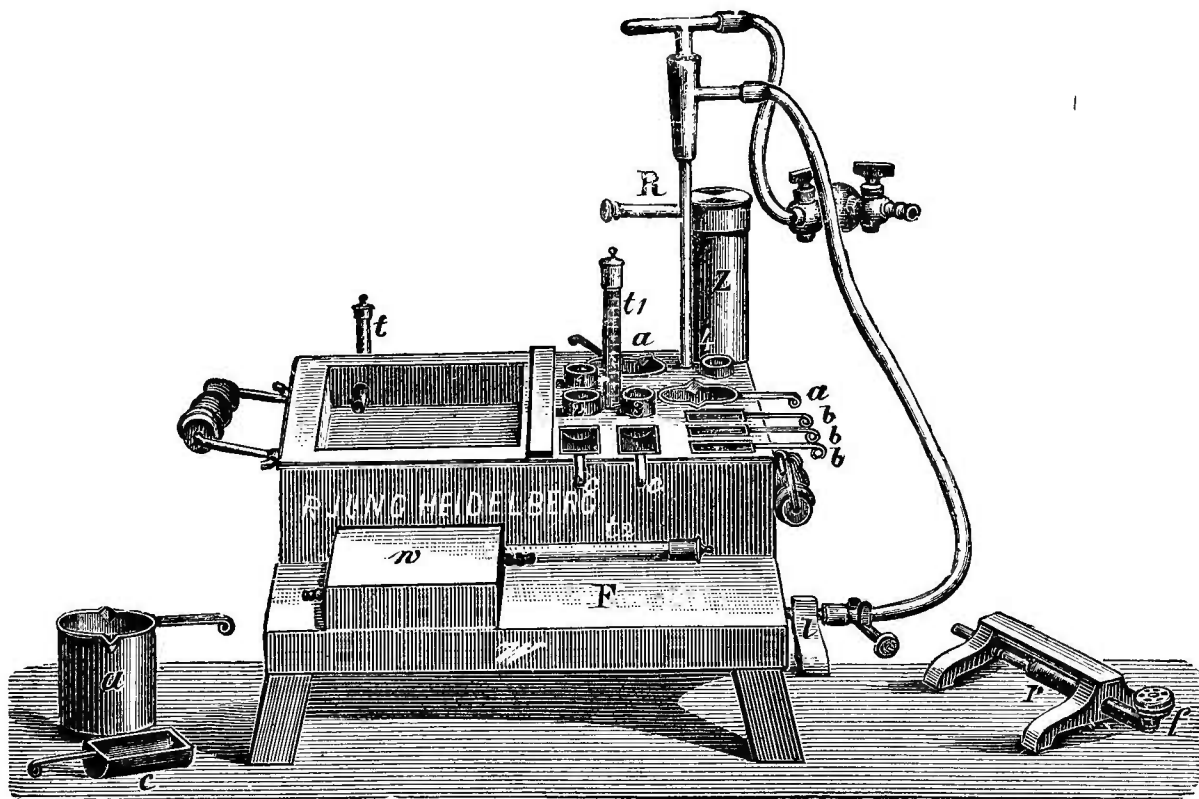


Fig. 48. — Stufa da paraffina, modello Stazione Zoologica di Napoli.

*a, a*, recipienti per la paraffina pura; *b, c*, recipienti per tenervi i pezzi con la paraffina; 1. 2. 3, tubetti per le miscele di rischiarante e paraffina. In *w*, piano per fare l'imparaffinamento con le forme; *F*, piano per tenervi i preparati; *z*, tubo per introdurre l'acqua; *t, t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>*, termometri *R*, termoregolatore.

La superficie della stufa verrà riparata dalla polvere con una lastra di vetro.

**205. Bruciatore Bunsen; lampadina microchimica.** — Necessario per riscaldare il termostato, il bagnomaria, per far bollire acqua, ecc.

La lampadina (fig. 48, *f*) si presta per mantenere la temperatura costante, quando si è già riscaldata l'acqua del termostato, o per esser messa sotto alla stufa.

**206. Sostegni in ferro verniciato.** — Per reggere dei recipienti quando si vuole scaldare l'acqua o filtrare qualche liquido.

**207. Riparo per il microscopio.** — Un semplice schermo, del quale ho già detto a pag. 5, è quello rappresentato dalla fig. 49.

**208. Termometri.** — Uno comune, di quelli così detti da banchi, si terrà appeso ad una parete del laboratorio, del quale è necessario

conoscere la temperatura. Un paio almeno di quelli esatti, cilindrici, senza bulbo, per il termostato e per la stufa.

**209. Termoregolatore.** — Ve ne sono moltissimi modelli; uno dei più economici, non assolutamente esatto, ma più che sufficiente per il termostato o per la stufa da paraffina, è quello del REICHERT (fig. 50).

Il termoregolatore s'introduce per un foro apposito nell'acqua della stufa o del termostato. Tutto il bulbo C dev'essere immerso nell'acqua. Un tubo di gomma mette in comunicazione la presa del gas col pezzo A; ed un altro tubo il pezzo B con la lampadina. Mediante la vite S si regola la colonna di mercurio in modo che la parte inferiore del tubo A rimanga aperta. In questo caso il gas passa in quantità rilevante; ma quando la temperatura è giunta

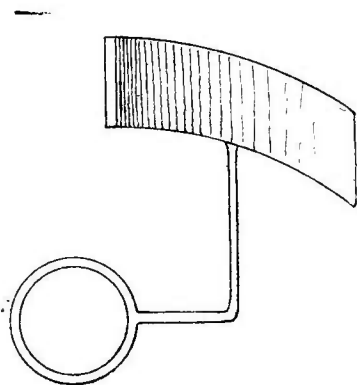


Fig. 49. — Schermo per riparare l'occhio durante l'osservazione al microscopio.

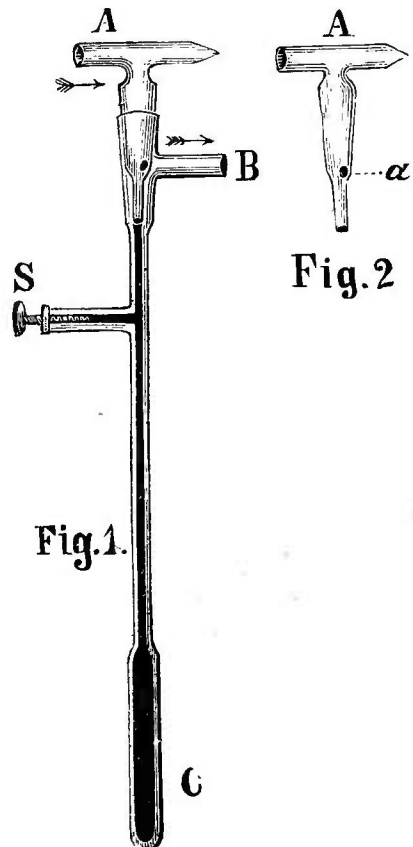


Fig. 50. — Termoregolatore REICHERT. Nella figura 48 lo si vede messo a posto.

al grado voluto, si chiude l'apertura, alzando con la vite S la colonna di mercurio, fino a giungere appena a contatto con l'orlo del foro. Così la fiamma diventa molto piccola, perchè il gas può uscire soltanto dal forellino  $\alpha$ . Quando la temperatura comincia a diminuire, il mercurio si contrae, la colonna si abbassa e il gas torna ad affluire in maggior quantità; ma allora la temperatura cresce, la colonna s'innalza ed il foro torna a chiudersi. Con queste continue alternative la temperatura si mantiene costante: regolandosi da per sè, finchè non avvengano delle forti ed improvvise variazioni nella pressione del gas.

**210. Tubo di gomma.** — Bisogna averne qualche metro e di calibro diverso; è importante provvedersi di quello di prima qualità, altri-



menti si sciupa prestissimo. Non si prenda mai nè di quello nero, nè di quello bianco liscio, e neanche quello rosso liscio, bensì quello rosso o bianco che all'esterno ha l'impronta della tela da lenzuola. Quello che non si adopera sia tenuto disteso, non ravvolto, in luogo oscuro ed umido, meglio dentro l'acqua, resa leggermente alcalina con l'ammoniaca.

**211. Bagno maria.** — Di rame, con sostegno apposito.

**212. Ferri chirurgici.** — Occorrono dei bistori, delle forbici e delle pinzette grandi, cioè di quelle dette anatomiche; ed altri piccoli, così detti da oculisti. Di forbici piccole si dovrà averne anche a cucchiaino e di piegate ad angolo; anche delle pinzette ne occorrono di quelle fatte a cucchiaino. I bistori dovranno essere tutti di metallo, non col manico di legno; e *tutti* gli strumenti dovranno essere nichelati. Le forbici non a vite fissa, ma con il foro su di una metà e il bottone fisso sull'altra, in modo da poterle smontare a volontà e senza fatica. Rammentarsi che il sublimato, le soluzioni osmiche e tutti gli acidi corrosivi intaccano il metallo.

Nel suo trattato il FOL consiglia e figura delle forbici e delle pinzette che stanno, invece che aperte, chiuse nella posizione di riposo, e che si aprono sol quando si esercita con le dita una pressione; in alcuni casi esse possono far comodo.

Per salvare i ferri dalla ruggine, si tengano sempre ben asciutti; e, quando non si devono adoperare per qualche tempo, è meglio lasciarli immersi nell'olio di vaselina.

Gli aghi occorrono molto spesso in istologia; si preparano economicamente infiggendo dalla parte della cruna degli aghi da cucire in un gambo sottile e cilindrico di legno dolce o di canna. Più sicuri sono quei manichi col pezzo superiore a vite, nel quale si pone l'ago, che poi resta fissato girando la vite.

Molto comodo fanno le sottili spatole metalliche, che possono essere di ottone e di alluminio, col gambo di legno.

**213. Cassettine da dissezione.** — Per le dissezioni sono comodi dei recipienti, ossia cassettoni di zinco, sul fondo delle quali si distende uno strato di cera vergine; dimensioni di cm. 4 per 8 e 6 per 15. Per tenervi infissi e distesi gli animali e gli organi da disseccare si adoperano degli spilli, e talora si prestano bene quelli doppi del LUDWIG. Quando si deve adoperare un liquido corrosivo, agli spilli di metallo si sostituiscano le comunissime punte spinose del Fico d'India.

**214. Spatole dritte e curve e di differente larghezza,** come pure pinzette, si devono avere di corno di bove. Hanno il grande vantaggio di poter essere adoperate con liquidi corrosivi, quali sono il sublimato, l'acido osmico, il nitrico, ecc. Di spatole occorre una provvista rilevante, da quelle larghe 2 mm. fino a quelle di 6-7 cm.

Così non solo i piccoli oggetti, ma anche i grossi e delicati animali potranno essere trasportati da un liquido all'altro con facilità e senza essere danneggiati.

Molto comode ed economiche sono le spatole di APÀTHY.

Si taglia da una penna di uccello un pezzo verso l'estremo, lungo circa 7 cm., e si denuda dalle barbule il rachide per due terzi della sua lunghezza, lasciandovele soltanto nella parte estrema. Il pezzo di rachide s'infigge in uno stecco di legno, tagliato longitudinalmente, e dopo si stringe con una legatura o con un pezzetto di carta ingommata. Queste spatole si prestano per trasportare oggetti molto delicati come, per esempio, le sezioni dal coltello.

Per affilare i coltelli occorre una buona pietra da rasoi ed un cuoio montato; maggiori indicazioni si trovano al § 121.

**215. Oggetti di porcellana.** — Dei piatti, delle vaschette rettangolari, di dimensioni differenti, come quelle che adoprano i fotografi, delle capsule di dimensioni varie. È utile anche qualcuna di quelle tavolette quadrate di porcellana che hanno la superficie liscia metà bianca e metà nera.

**216. Oggetti di vetro.** — Questi sono moltissimi e molto diversi.

*Bottiglie*, con tappo smerigliato: si preferiscano quelle (fig. 51) col tappo piano superiormente; esso ha parecchi vantaggi sulla forma solita: può essere deposto, rovesciandolo, sul tavolo senza far toccare la parte che penetra nel collo della bottiglia; ripara bene dalla polvere; permette una più facile e comoda chiusura col pezzo di vescica quando la bottiglia deve essere imballata e spedita lontano.

Se si vuole che i tappi chiudano bene, bisogna che ciascuno sia fatto per quella data bottiglia, e in tal caso questa e quello portano un numero inciso col diamante.

Le solite bottiglie sono poco adatte, e sarebbe una economia sbagliata preferirle a quelle che ho consigliato, per spender meno nell'acquisto.

Il collo della bottiglia deve avere un labbro sporgente orizzontale. Non si faccia mai uso di quelle che ne mancano, e che hanno invece soltanto un ingrossamento cilindrico; con queste ultime sarà impossibile versare a gocce.

Di bottiglie ne occorre una provvista rilevante, cominciando da quelle grandi da 800-1000 cc., poi da 500, 300, 200, 150, 100, 80, 50, 20; e delle dimensioni più piccole, da 200 in giù, si dovrà averne un paio di dozzine per ogni misura.

*Vasi e barattoli*, con tappo smerigliato, piano superiormente. Sebbene in non grande quantità pure bisognerà avere una provvista discreta degli uni e degli altri, della capienza di 500, 200, 100, 50 e 25 cc.

*Bottigliette con contagocce*, e col tappo smerigliato. Comodissime perchè il tappo e il contagocce sono una cosa sola; servono specialmente per le piccole quantità di alcool assoluto, di xilolo, di alcool assoluto + cloroformio, oppure alcool assoluto + xilolo, ecc., che si devono avere sul tavolo, alla mano. Se ne potrà tenere una serie, tutte di poca capienza; le più grandi da 150 cc., altre da 100 e da 50 cc. In commercio si trovano i pezzetti di tubo di cauciù chiusi ad un estremo e che s'infilano sul rigonfiamento del tappo-contagocce.

*Vasetti cilindrici* per tenervi i liquidi, nei quali devono essere posti, per i soliti trattamenti, i portaoggetti con attaccate le sezioni. Ve ne sono di due forme:

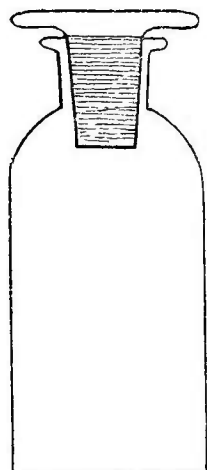


Fig. 51. — Modello di bottiglia con tappo piano superiormente.

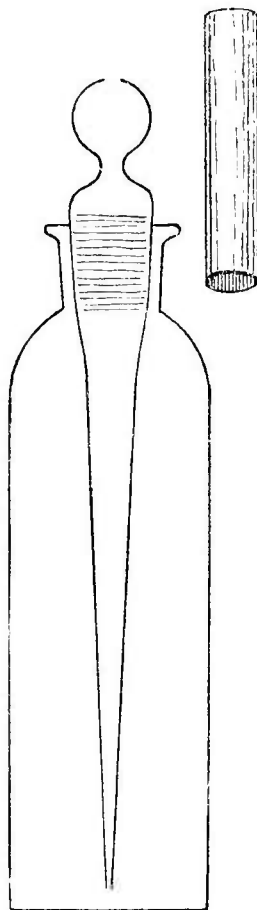


Fig. 52. — Bottiglietta con tappo contagocce.

quella più economica ha un coperchio fatto a cappello, che si rompe abbastanza facilmente, e che ha una chiusura poco ermetica. Più costosi, ma di maggior durata e che chiudono bene, sono quelli che si coprono con un disco piano provvisto di un solco circolare nel quale penetra l'orlo del vasetto. Vedi le figure 25 e 26 a pag. 112.

Tuttavia questi vasetti hanno, a mio modo di vedere, una utilità limitata; non li consiglierei nè per l'alcool assoluto, nè per il xilolo od altro rischiarante, e in fondo in fondo non li credo utili neanche per le sostanze coloranti. Infatti, è evidente che, per esempio, l'alcool assoluto, dopo aver servito per disidratare uno o due preparati, sarà tutt'altro che tale, ma al più dell'alcool a 97-98 %. Anche le sostanze coloranti verranno allungate, in parte ridotte o comunque

alterate, dopo aver servito qualche tempo. Ora, se si pensa che ognuno di quei vasetti contiene, poco su poco giù, 50 cc. di liquido, si vedrà che si ha un sensibile dispendio, quando si voglia cambiarlo spesso; e se questo non si facesse si compirebbe male l'operazione. Per ciò è meglio adoperare questi vasetti per le sostanze che non si alterano, che possono servire a lungo, o che sono di poco costo. Così, per esempio, per il xilolo e per l'alcool assoluto, ai quali sia aggiunto qualche cristallo di jodo per levare l'eccesso di sublimato rimasto nelle sezioni; un altro servirà per l'acqua con 1 % di allume; altri ancora per l'acqua distillata pura, od acidulata con acido acetico. Dando la preferenza al metodo di attaccare le sezioni al vetrino (coprioggetti) invece che alla lastra (portoggetti), si ha bisogno di una minore quantità di liquido.

*Scatole rettangolari*, con l'orlo smerigliato e coperte con un pezzo di vetro piano smerigliato. Sono più costose dei vasetti, dei quali ho detto qui sopra, ma hanno il vantaggio di far risparmiare il reagente che si adopera quando vi si depone nel fondo la lastra od il vetrino con le sezioni. Del resto basta averne un piccolo numero.

*Vasetti per le resine e per l'olio da immersione.* — Per queste sostanze spesse e attaccaticce occorrono, per l'uso continuo, piccoli recipienti molto larghi di apertura e col coperchio a cappello, ma bene smerigliato. Non sono niente affatto da consigliare nè quelli che invia e che figura lo ZEISS nel suo catalogo (fig. 3), perchè il lungo tratto di collo si sporca assai facilmente, sì che il coperchio finisce per aderire al vaso, e d'altra parte la bacchetta centrale, ch'è saldata con un mastice al coperchio, finisce con lo staccarsi. Neanche sono comodi quei vasetti nei quali il tappo smerigliato si prolunga in un bastoncino di vetro fino in fondo al recipiente, e che all'esterno portano un cappello smerigliato per riparo. Anche questi finiscono, dopo poco tempo, col diventare indecenti ed inservibili, a cagione dell'olio che cola all'esterno.

Molto più adatte sono quelle semplicissime, tutte e due riparate da un semplice cappello smerigliato, senza tappo e con la bacchetta di vetro isolata, descritte a pag. 121, figure 27 e 28. La seconda forma è del FOL <sup>1)</sup>; la prima, ancora più semplice, è di pochissimo costo. Se per caso una goccia di olio o di resina sporca l'esterno, e questo non succederà che raramente, si potrà asciugare con un cencio intriso nel xilolo. Si può obiettare che questa forma di recipiente non dà una chiusura molto ermetica; ma questo non è un inconveniente, quando vi si mette poca quantità di liquido.

<sup>1)</sup> Recentemente ne ha dato per suo uno di simile e meno adatto ARTHUR MEYER in *Zeit. wiss. Mikr.*, 14. 1897, p. 174. Vedi nel FOL (*Lehrbuch*, pag. 140) la fig. 71.

• *Campanelle.* — Servono per coprire e riparare dall'aria le preparazioni od altri oggetti; ne occorrono diverse e di differenti dimensioni. Due o tre di grandette, del diametro di 15-20 cm., e parecchie di 8-10 cm.

*Camera umida.* — Si fa economicamente con un piatto fondo, o un cristallizzatore ed una campanella. Si versa un dito d'acqua sul fondo e si mette un sostegno qualunque al disotto della campana per reggere le preparazioni.

*Cristallizzatori.* — Recipienti cilindrici, alti da 4 a 10 cm. col diametro da 8 a 30 cm.; i più grandi scoperti (si coprono al bisogno con un pezzo di lastra di vetro qualunque), i più piccoli con l'orlo smerigliato e coperti con un disco smerigliato.

*Tubi di retro.* — Provette robuste, non quelle fragili usate dai chimici, di vetro grosso e senza l'orlo sporgente, da chiudersi con tappo di sughero. Ne occorrono di molto piccole, di 5 cm. di lunghezza e  $\frac{1}{2}$  cm. di diametro interno, fino a quelle di 15-20 cm. e 5 di diametro.

Occorrono poi veri tubi lunghi e sottili, forati alle due estremità; quelli di vetro tedesco si lavorano meglio alla fiamma di quelli francesi. Servono continuamente per farsi da sè dei tubetti a punta affilata, dei contagocce, dei tubi ricurvi, dei sifoni, ecc.

*Saliere.* — Sono dei piccoli recipienti di cristallo, con una cavità poco meno che emisferica (pag. 128, fig. 29), comodissimi per i piccoli oggetti, che vi possono essere presi facilmente con le spatole. Alcune dovranno essere di vetro nero.

*Bastoni di vetro,* sottili, che si possono fare a pezzi, arrotondando poi i due estremi alla fiamma; servono per pigliare il liquido a gocce, per mescolare liquidi corrosivi o molto caldi, ecc.

*Imbuti.* — Di grandi, della capacità di 500 cc., ne basta uno solo; e poi alcuni da 200, 100, 50 cc.

*Pipette contagocce.* — Si possono far da sè, tirando alla fiamma un pezzo di tubo di vetro, tenuto ai due estremi con le mani e riscaldato nel centro. Si separano i due pezzi così ottenuti, e ad ognuno di questi si mette dalla parte cilindrica un pezzetto cilindrico di cauciù, come quello che si scorge nella fig. 52 (si trovano in commercio). L'estremo affilato opposto avrà un'apertura più o meno grande, secondo che si è tirato più o meno il tubo assottigliato.

Bisogna avere delle pipette con la punta affilata, ad apertura strettissima, per poter fare quelle siringhe da iniezioni di cui ho detto a pag. 131. Poi parecchie altre con la punta meno affilata e l'apertura più grande. Un certo numero dovrà avere un'apertura di 2-3 mm., per servire quando si vogliono aspirare uova, larve, piccoli animali, ecc. da un liquido e trasportarle ad un altro senza toccarli.

*Vetri da orologio.* — Di diametri diversi, da 7 a 10 cm.

*Bicchieri a calice.* — Anche di questi una piccola provvista di dimensioni differenti.

*Matracci.* — Recipienti sferici di vetro sottile che resiste al fuoco. Bisogna esserne provvisti, appunto per avere modo di riscaldare l'acqua od altri liquidi; ne occorre uno grande, da 500 cc., e poi diversi da 200, 150, 100 cc.

*Portaoggetti incavato* <sup>1)</sup>. — Di mm. 75 × 45, grosso 6 mm. e con una incavatura del diametro di mm. 35 nel mezzo. Serve per l'esame del plankton, a debole ingrandimento.

**217 Carta da filtro, carta bibula.** — Se ne deve avere una buona provvista e di due qualità, una più sottile e l'altra più grossa. Quest'ultima dovrà essere satinata (vedi nota a pag. 110).

## CAPITOLO XX.

### Reagenti.

Sono numerosissimi; e non è necessario ch'io ricordi qui particolarmente tutti quelli dei quali è stato fatto via via parola nei diversi capitoli; ma alcune cose sarà bene accennare adesso.

**218. Acqua distillata.** — Si trova in commercio, ma spesso è tutt'altro che pura. Si potrà fare facilmente da sè un piccolo impianto per distillarla: si acquista una grande storta di vetro col collo piegato ed allungato, e la si mette in comunicazione con un tubo di vetro ripiegato a serpentino. Quest'ultimo si fa entrare in un recipiente di zinco cilindrico, nel quale arriva un filo continuo di acqua fredda (proveniente dalla parte inferiore, mediante un piccolo tubo cilindrico), che si scarica dalla parte superiore. Messa la storta, piena, quasi, d'acqua, sopra un sostegno, ed acceso al disotto un bruciatore di BUNSEN, quando l'acqua bolle, il vapore se ne va per il collo e, arrivato al serpentino, si condensa; con un recipiente si raccoglie l'acqua distillata. Essa, alla carta di tornasole, *deve reagire neutra*.

**219. Alcool.** — Ne occorre molto e costa molto, ecco l'inconveniente insuperabile; e costa molto non già per il suo valore intrinseco, ma per la tassa enorme che lo colpisce. Fare economia di alcool, adoperando quello già usato, è sempre pericoloso in istologia! Si può risparmiare qualche cosa facendo l'acquisto non già dal droghiere o, peggio, dal farmacista, ma da un buon negoziante grossista, e prendendone una damigiana da 10 Kg. almeno per volta. Si trova in commercio del buon alcool etilico che supera anche di 3 e 4 gradi il titolo solito, ch'è di 90 ‰. Questo è l'alcool forte che nel testo ho comunemente chiamato: «alcool a 95 ‰». E con esso, e con un

<sup>1)</sup> Dei soliti porta e coprioggetti s'è detto a pag. 144.

semplice alcoolometro, si potranno fare gli alcoolici di forza diversa, con l'aiuto delle due tabelle qui unite. Con la prima si può ridurre un alcool da 90 % ad un altro di grado inferiore qualunque, con l'indicazione dei volumi d'acqua distillata che si devono aggiungere. Lo scopo della seconda è il seguente: l'alcoolometro di GAY LUSSAC è corretto per la temperatura di 15° C.; se la temperatura aumenta le indicazioni dell'alcoolometro superano la forza reale dell'alcool, se diminuisce sotto i 15° C. le indicazioni sono inferiori. Non ho creduto che valesse la pena di dare le correzioni per le temperature basse, perchè in un laboratorio d'istologia non si dovrà mai essere al disotto di 14-15° C., a meno di non rinunciare a lavorare col microscopio; ho dato invece la tabella delle correzioni di 2 in 2 gradi centigradi da 15° a 25° C., temperatura quest'ultima che solo per poco tempo e non in tutte le ore del giorno viene superata in Italia.

**220. Tabella I**, indicante i volumi d'acqua che si devono aggiungere ad un alcool di un dato grado, per ridurlo ad un grado inferiore determinato.

	90	85	80	75	70	65	60	55	50
85	6.5								
80	13.8	6.8							
75	21.9	14.5	7.2						
70	31	23	15.3	7.6					
65	41.5	33	24.7	16.4	8.2				
60	53.7	44.5	35.4	26.5	17.6	8.8			
55	68	58	48	38.3	28.6	19	9.5		
50	85	74	63	52.4	42	31.2	20.5	10.3	
45	105.3	93.3	81.4	69.5	58	46.1	34.5	23	11.4
40	131	117.3	104	91	77.6	64.5	51.4	38.5	25.5
35	163.3	148	133	118	103	88	73.1	58.3	43.6
30	206.2	188.6	171	153.6	136	119	102	81.5	67.5

*Modo di servirsi della tavola:* Nella prima linea orizzontale è indicato il % dell'alcool dato; nella prima linea verticale il % dell'alcool desiderato. Al punto d'incontro i volumi (interi e decimi) dell'acqua da aggiungere.

*Esempio:* Se ho dell'alcool a 70 %, e voglio ridurlo a 50 %, a 100 volumi di alcool dovrò aggiungerne 42 d'acqua.

**221. Tabella II**, indicante per ogni due gradi centigradi, da 15 a 25, le differenze fra la forza dell'alcool indicata dall'alcoolometro di GAY LUSSAC, e quella effettiva per una determinata temperatura.

*La graduazione normale è fatta a 15° C.*

	60	65	70	75	80	85	90	95
15	60	65	70	75	80	85	90	95
17	59.3	64.3	69.3	74.3	79.4	84.4	89.5	94.6
19	58.6	63.7	68.7	73.7	78.8	83.9	88.9	94.1
21	57.8	63.0	68.1	73.1	78.2	83.3	88.4	93.7
23	57.1	62.3	67.4	72.5	77.6	82.7	87.9	93.2
25	56.5	61.6	66.7	71.8	77.0	82.1	87.4	92.7

*Modo di servirsi della tavola:* Nella prima linea orizzontale si legge il % dell'alcool di 5 in 5 gradi, da 60 a 95 %; nella prima linea verticale i gradi del termometro centigrado di 2 in 2, da 15 a 25. Al punto d'incontro la forza reale dell'alcool.

*Esempio:* Se l'alcoolometro di GAY LUSSAC segna che la forza di un alcool è di 90 % e se la temperatura è di 23° C., la forza reale di quell'alcool sarà di 87.9 %.

Se si ha un alcool di forza intermedia fra quelle segnate, e se la temperatura è data da un grado pari, si prenderà un valore medio. Così, per esempio, con alcool a 72 % e temperatura di 20° C., la forza vera sarà circa di 70 %.

**222. Alcool assoluto o alcool anidro.** — Si trova in commercio, ma costa molto più caro di quello solito a 90-92 %: si avverta che il vero assoluto o anidro dovrebbe segnare all'alcoolometro 100, ma ben difficilmente lo si trova di questa forza. I migliori fabbricanti, come ad esempio il MERK, lo garantiscono di oltre 99 gradi; generalmente è venduto in recipienti da un litro. Converterà sempre provvederne in questa quantità, per avere un recipiente venuto direttamente dalla fabbrica e non manomesso.

Di solito l'alcool a 99 % basta per le esigenze della tecnica, ma può darsi che talvolta occorra averlo proprio anidro, e d'altra parte bisogna evitare che da 99 % scenda a meno, con l'assorbire il vapore acqueo (del quale è avidissimo) contenuto nell'atmosfera. Questo si può impedire da una parte col tenerne alla mano soltanto delle piccole quantità, e lasciando ben tappata e sigillata la bottiglia che contiene il grosso della provvista. In secondo luogo anche il piccolo



recipiente che si tiene sul tavolo sarà provvisto di un buon tappo smerigliato; e, finalmente, dentro di questo recipiente si terranno dei pezzi di solfato di rame, abbrustolito in una capsula di porcellana finchè si sia calcinato, cioè sia diventato anidro. Questo solfato di rame calcinato, tenuto in fondo al recipiente dell'alcool assoluto, tende a sottrarre, appropriandosela, tutta l'acqua che quello può via via assorbire dall'aria. Invece del solfato di rame calcinato, qualcuno si serve di un'amalgama di alluminio, che è pure avidissima di acqua, e che si prepara facilmente fondendo, in una capsula di porcellana, al calore dei pezzetti di alluminio tenuti immersi in una soluzione concentrata di sublimato corrosivo.

L'alcool assoluto può essere fatto anche da sè, quando si abbia del buon alcool a 94-95 %, ricorrendo a delle disidratazioni successive con del solfato di rame calcinato. In un recipiente a collo largo si mette l'alcool a 94-95 % con dei grossi cristalli di solfato di rame calcinati (si usi precauzione nel maneggiarli, perchè vanno facilmente in polvere), e vi si lascia per 48 ore. Dopo questo tempo, si travasa l'alcool in altro recipiente, con altri pezzi di solfato di rame calcinato, e dopo 24 ore si ripete l'operazione una terza volta. Per levare la rilevante quantità di solfato di rame in polvere che rimane sospeso nell'alcool (ma che non vi si discioglie), sarà bene filtrare rapidamente l'alcool e prima di riporlo vi si immergerà con precauzione qualche altro pezzo di solfato calcinato. La filtrazione verrà fatta in una giornata ed in un locale asciutto.

Di recente<sup>1)</sup> venne proposto d'immergere un pezzetto di carburo di calcio nell'alcool assoluto, per assicurarsi se è veramente tale, o se contiene tracce di acqua, la cui presenza sarebbe rilevata dal caratteristico odore di acetilene che si formerebbe. Ma invero il metodo non è di nessun valore, perchè il carburo di calcio è così avido di acqua che, appena tolto dal vaso nel quale è contenuto e tenuto a contatto con l'aria, si appropria del vapore acqueo, dando tosto l'odore di acetilene.

La presenza dell'acqua nell'alcool assoluto è rilevata facilmente dal comparire di un intorbidamento quando lo si mescoli col cloroformio col xilolo, e più ancora con l'olio di garofano, di legno di cedro o col benzolo.

**223. Sostanze coloranti, oli essenziali, ecc.** — Per tutti questi consiglio caldamente di farne acquisto soltanto da negozianti capaci e che conoscano la tecnica istologica. Sono sicuro di non sbagliare dicendo che in Italia non ve n'è neanche uno che riunisca queste qualità; bisogna quindi ricorrere all'estero. Una ditta meritevole di

<sup>1)</sup> YVON, in *Compt. rend.*, tome 125, 1897, p. 1181.

essere raccomandata è quella, già ricordata, di GRÜBLER e C., Leipzig, Germania. Dietro richiesta (e si può corrispondere anche in francese), essa manda il proprio listino coi prezzi. Questi sono piuttosto elevati; tuttavia ho trovato non di rado che sono inferiori, *anche di molto*, a quelli di negozianti italiani. Ma il vantaggio che si ha col servirsi dal GRÜBLER è quello di poter avere quasi sempre della merce ottima; e quanto alla spesa, essa è limitata, perchè i più diversi reagenti possono essere acquistati anche in quantità piccolissime, come ho già detto per l'acido osmico (pag. 33). Il GRÜBLER ha sempre pronte le più comuni soluzioni, ed ora ha anche introdotto, per parecchie soluzioni coloranti, l'uso delle pastiglie in tubetti. Così, per esempio, egli vende delle pastiglie di emallume di peso determinato, ognuna delle quali va sciolta in un dato volume di acqua; così si ha il vantaggio di avere sempre le soluzioni fresche, perchè se ne prepara una piccola quantità per volta. Certamente, acquistando le soluzioni già fatte o le pastiglie, la spesa effettiva è maggiore di quella che si farebbe comperando le sostanze coloranti e preparandosi le soluzioni da sè, ma ad ogni modo si tratta sempre di spese piccole.

**224. Sublimato corrosivo, altri sali, acidi, ecc.** — Questi possono essere acquistati anche in Italia, sia ricorrendo ai grandi stabilimenti, come l'ERBA di Milano, o ai grossisti, come il MARTIGNONI e MELA di Genova, il BIZZARRI o il PEGNA di Firenze, ecc. Si ricorra dal farmacista solo quando non si può fare diversamente, perchè il costo dei prodotti è sempre molto maggiore. Volendo fare acquisti rilevanti, cioè di qualche centinaio di lire, meglio è rivolgersi direttamente ad un grande stabilimento, come per esempio, il MERK di Darmstadt (Germania), dal quale, come da tutti gli altri fabbricanti, si potrà avere il listino dei prezzi. Dal MERK, oltre ai sali e agli acidi, si potrà avere anche il xilolo, la paraffina, l'alcool assoluto, la glicerina, l'acido acetico, ecc.

**225. Acqua di anilina.** — In commercio si trova l'anilina, detta anche olio di anilina; è un liquido leggermente colorato in giallo e di un colore gradevole, che col tempo si fa oscuro, meno limpido e di un odore quasi ingrato. Per conservarlo, bisogna tenerlo in recipienti ermeticamente chiusi; o, meglio ancora, se ne provvederà poco per volta, esigendo dal negoziante di quello buono e fresco. Per fare l'acqua di anilina si prendono 3 cc. di anilina e si mescolano con 100 cc. di acqua distillata, quindi si chiude dentro una bottiglia di contenuto doppio e si sbatte il liquido con forza e a lungo finchè l'olio si sia bene mescolato con l'acqua. Questa soluzione va rinnovata di frequente.

**226. Liquidi che evaporano.** — Per essere conservati in buon stato si devono tenere in recipienti ben chiusi; meglio di tutto con un

tappo di *sughero buono e asciutto*, e poi ricoperto con *ceralacca*. Nel fare questa operazione si tenga sempre il recipiente dritto, in modo che il liquido non vada *mai* a bagnare il tappo. Se il recipiente ha un buon tappo di vetro smerigliato, si completerà la chiusura col distendere con un pennello o con un bastoncino riscaldato della *paraffina fusa* fra il tappo e il collo. Un buon riparo è anche quello di chiudere il vaso, dopo messo il tappo, con un pezzo di vescica bagnata, che si lega strettamente al disotto dell'orlo del vaso; quando la membrana asciuga, si distende ed aderisce bene al vetro.

Tali indicazioni valgono per le sostanze che non si adoprano di continuo; queste ultime si terranno sul tavolo in piccola quantità e dentro recipienti che chiudano bene, mentre la porzione maggiore sarà riposta con le cure richieste, come sopra si è detto.

**227. Numero di gocce approssimativo corrispondente ad 1 grammo e ad 1 centimetro cubo.**

Liquidi	1 g.	1. cc.
Acido acetico concentrato (da 50 a 80 %)	16	17
» cloridrico 35 %, peso specifico 1.18	12	14
» nitrico concentrato 32 %, peso spec. 1.20	10	14
» solforico a 66° B., peso spec. 1.842.	10	26
Acqua distillata	14	14
Alcool assoluto	44	36
Cloroformio	26	40
Creosoto	25	27
Etere	50	40
Olio di bergamotto	25	22
» cedro	25	25
» garofano	20	20
» lavanda	25	22
» origano	25	22
» trementina	25	21
Potassa caustica, soluzione al 70 %	16	30

**NB.** — Le cifre sono approssimative, perchè la grossezza di una goccia varia col variare del recipiente o del bastoncino di vetro adoperato. Solamente le gocce fatte cadere da una superficie orizzontale sono perfettamente eguali fra di loro.

**228. Peso specifico di alcune sostanze** (a 15° C., l'acqua distillata a 4° C. essendo = 1.000):

1. Acido acetico glaciale	1.055
2.                    concentrato (66 $\frac{0}{10}$ )	1.071
3.                    »                    allungato (50 $\frac{0}{10}$ )	1.065
4. Acido cloridrico concentrato (42 $\frac{0}{10}$ )	1.210
5.                    »                    ordinario (33 $\frac{0}{10}$ )	1.166
6. Acido nitrico concentrato (68 $\frac{0}{10}$ )	1.414
7.                    »                    ordinario (31 $\frac{0}{10}$ )	1.19
8. Acido solforico concentrato (66° Baumé)	1.84
9. Alcool assoluto	0.729
10. »                    a 90 $\frac{0}{10}$ .	0.794
11.                    a 50 $\frac{0}{10}$	0.919
12. Benzina	0.695
13. Benzolo <sup>1)</sup>	0.880
14. Cloroformio	1.49
15. Glicerina concentrata pura	1.262
16.                    allungata con 50 $\frac{0}{10}$ di H <sup>2</sup> O	1.128
17. Olio di bergamotto	0.865
18.                    di garofano	1.050
19.                    »                    di legno di cedro	0.984
20.                    di origano	0.930
21.                    »                    di trementina	0.885
22. Paraffina	0,900
23. Xilolo <sup>1)</sup>	0.860

<sup>1)</sup> A pag. 68, dove è detto del benzolo e del xilolo « essendo *più leggeri* dell'alcool », correggi: « essendo *poco più pesanti* dell'alcool ».

PARTE SECONDA

**TECNICA SPECIALE**





## CAPITOLO XXI

### Metodi citologici

~~~~~

**229. Esame a fresco.** — Ne ho già parlato nel capitolo XIV, sia per indicare come si fanno le osservazioni su cellule viventi, sia per dire come si uccidono e si preparano nel liquido così detto indifferente o conservatore nel quale poi saranno studiate.

Le cellule viventi possono essere uccise e colorate mentre si osservano al microscopio, facendo passare sotto il vetrino una goccia di soluzione osmio-acetica (1 % acido osmico, 2 % acido acetico glaciale) allungata con 2 vol. d'acqua; quindi si fa arrivare una goccia di soluzione di verde di metile 1 %, acido acetico 0,5 %.

Od anche la cellula che si conserva nel liquido può essere fissata col tenere il portaoggetti sul quale è la goccia per 1-2 minuti capovolto sopra l'apertura della bottiglia che contiene l'acido osmico. In questo modo la fissazione viene compiuta dai vapori.

Altre volte serve bene far arrivare a contatto col liquido una goccia di soluzione acquosa di sublimato, allungata 8-10 volte.

Il LEE raccomanda il metodo ch'egli chiama *classico*, e che corrisponde alle indicazioni del CARNOY (1884): acido osmico e verde di metile, liquido di RIPART e PETIT (p. 118), nel quale si può conservare il preparato. Ma io credo miglior partito passare poi il preparato in glicerina, o meglio ancora nel sciroppo-gomma di APÀTHY (§ 145).

**230. Materiale fissato.** — Sull'influenza delle diverse soluzioni dei fissativi sul nucleo, vedi i lavori del FLEMMING, da quello classico del 1882 <sup>1)</sup> agli altri recentissimi.

---

<sup>1)</sup> W. FLEMMING, *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*.

penetrare rapidamente, gonfiando e rischiarando il protoplasma e il vitello; e quindi permettendo di ottenere, anche con grosse sezioni, delle figure cariocinetiche molto chiare e facilmente colorabili.

**232. Colorazione cellulare.** — Dopo quanto è stato indicato, specialmente nel capitolo IV, non occorre qui aggiungere quasi niente. I colori preferiti saranno quelli più adatti per le sezioni, quindi il carmallume, i colori acquosi dell'emateina e, più di tutti, i colori di anilina, il verde di metile, la saffranina, la tionina, ecc. Anche il metodo di HEIDENHAIN all'ematossilina ferrica dà una buona colorazione cellulare.

Come colore plasmatico, per mettere in evidenza il centrosoma, l'HEIDENHAIN (1894) ha proposto il Bordeaux R. prima dell'ematossilina ferrica. Le sezioni di materiale fissato con sublimato sono tenute per 24 ore in una soluzione leggera di Bordeaux R., e poi passate nell'allume ferrico finchè la cromatina sia quasi scolorata del tutto; allora si mette nell'ematossilina, e poi si riduce con l'allume (§ 75). Invece del Bordeaux R si può prendere il blu di anilina o il blu acqua.

**233. Materiale di ricerca.** — Per lo studio della cellula in generale il materiale è abbondantissimo, e non è il caso di dare indicazioni, perchè tutti i protozoi, le cellule dei nostri epiteli, di tanti organi degli animali, del sangue, della linfa, ecc., possono servire allo scopo. Solo basterà ricordare che per le rilevanti dimensioni delle loro cellule si prestano specialmente (oltre ai protozoi) i tessuti degli anfibi, degli urodéli in particolare.

Indicazioni più precise occorrono per la cariocinesi; qui è da consigliare in particolar modo l'epitelio delle branchie e l'epidermide delle larve di anfibi urodéli. Poi tutte le uova, ma fra queste in particolar modo quelle dell'*Ascaris megalocephala* e dei polieladi in generale. Materiale, quest'ultimo, che si può avere quando si voglia, rivolgendosi alla Stazione Zoologica di Napoli. Ho già ricordato, per le dimensioni del centrosoma e per la vistosità della sfera d'attrazione, una planaria che è comune a Napoli: la *Jungia*. Anche le uova delle sanguisughe marine (*Branchiobdella*) sono molto adatte, oltre che per la visibilità del centrosoma, per il piccolo numero dei cromosomi.

Per lo studio del nucleo in riposo, buon materiale offrono le cellule di parecchi artropodi, e son famose quelle delle glandole salivari e dei testicoli di parecchi insetti e crostacei. Fra i ditteri la larva di *Chironomus*, di *Ptycoptera*, ecc.

**234. Ricerca del ferro nelle cellule.** — Lo SCHNEIDER<sup>1)</sup>, che se n'è oc-

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1895, p. 208; ivi si troverà anche la bibliografia. Per questa vedi anche il lavoro del CARAZZI.



cupato a lungo, consiglia questo metodo: le sezioni attaccate al vetrino con acqua distillata, ottenute da materiale fissato con l'alcool od anche col sublimato, sublimato acetico, sublimato alcoolico, sono passate nell'acqua, sgocciolate di quella superflua e poi ricoperte per dieci minuti con due gocce di ferrocianuro giallo ( $\text{Fe Cy}^6 \text{K}^4$ ) in soluzione all'1  $\frac{1}{2}$  % nell'acqua. Tolto, aspirando con carta bibula, il sale di ferro, si lava con una o due gocce di acqua distillata acidulata all'1 % con HCl. Poi si lava con acqua e si lascia per qualche minuto esposto all'aria. Il ferro si rivela con la colorazione blu (blu di Prussia), volendo si può fare anche una colorazione rossa (saffranina, carmallume) di contrasto. Poi si disidrata e si chiude nella resina, oppure dall'acqua si passa nella glicerina e da questa nella glicerina gelatina. I preparati si conservano all'oscuro.

« Malgrado numerose prove fatte, non sono riuscito a farmi una idea chiara della ragione per cui la reazione talora avveniva e tal altra no. È importante tener conto di questa incertezza dei risultati per non trarre troppo presto conclusioni negative da quelli negativi. Mi è parso che la reazione si mostrasse più difficilmente quando la soluzione del ferrocianuro era troppo fresca e così pure quando data da molti giorni; perciò usavo servirmi sempre di una che contasse più di uno e meno di dieci giorni. Passato questo tempo la rinnovavo » <sup>1)</sup>.

L'acido cloridrico dev'essere *purissimo*. Sono opportune le esperienze di controllo. I preparati non sono, ad ogni modo, di lunga durata e il colore azzurro svanisce. Tuttavia non è difficile scorgere ancora il ferro, il quale si mostra di un colore giallo. Altre volte il CARAZZI (L. c.) ricorse all'azione dell'acido osmico prima del trattamento con la soluzione del ferrocianuro. Le sezioni levate dall'acqua sono esposte ai vapori dell'acido osmico (basta mettere il vetrino che le porta capovolto sull'apertura del recipiente che contiene la soluzione 1 %) per un quarto d'ora, quindi si sottopongono alla siderosi, come sopra si è detto. Anche questa reazione è incerta.

Per la ricerca del ferro nel nucleo, vedi MACALLUM <sup>2)</sup>, e per quella del ferro nel nucleolo vedi T. LIST <sup>3)</sup>, e CARNOY e LEBRUN <sup>4)</sup>.

---

<sup>1)</sup> CARAZZI, *Ricerche sull'assorbimento del ferro, etc.*, in Intern. Monatschr. Anat. Phys., 14. 1897, p. 134.

<sup>2)</sup> In *Journal Physiology Cambridge*, 22. 1897, p. 92.

<sup>3)</sup> In *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 12. 1896, p. 408.

<sup>4)</sup> In *La Cellule*, 12. 1897, p. 273.

*STUDIO DEL SANGUE.*

**235. Generalità.** — Il metodo più semplice per studiarlo consiste nell'estrarre una goccia dall'organismo ed esaminarla a fresco, oppure distenderla su di un vetrino, disseccarla col calore o fissarla con i vapori d'acido osmico, colorarla e fare il preparato permanente. Questi sono i soli metodi che ci permettono di esaminare il sangue dell'uomo e di tutti quei mammiferi che non possiamo sacrificare: ed è anche il modo più generalmente usato per lo studio del sangue dei vertebrati inferiori e di molti invertebrati.

Naturalmente per i vertebrati a sangue caldo, l'osservazione a fresco, senza reagenti, non si può continuare che a condizione di mantenere riscaldato il tavolino del microscopio alla temperatura normale del corpo dell'animale; è a questo scopo servono i tavolini riscaldabili di MAX SCHULTZE e di tanti altri.

Ma, a parte i casi, come quello dell'uomo, nei quali non è possibile fare altrimenti, e nei quali, per necessità, dovremo limitare l'esame istologico del sangue a quello di una goccia estratta dal corpo e distesa sul vetro, non v'è dubbio che questo metodo non è certamente il migliore per fare delle ricerche citologiche sugli elementi del sangue, e può essere consigliato soltanto per lo studio grossolano. Sono infatti così intimi i rapporti del sangue con le pareti vasali, così pronte le alterazioni del plasma e quindi anche quelle dei rapporti fra il plasma e gli elementi, che il solo fatto di levare la goccia di sangue dall'interno del vaso, di metterlo a contatto col vetro e di esporlo all'azione dell'aria, costituiscono per gli elementi di esso tante cause di alterazione, che possono spiegarci i madornali errori nei quali caddero poco esperti osservatori.

**236. Esame a fresco.** — Si preferisce allungare il sangue aggiungendo alla goccia di sangue una goccia di soluzione di cloruro sodico, perchè così riesce più facile l'esame degli elementi.

In tutti i trattati di tecnica s'indica la così detta soluzione fisiologica 0.75 ‰. Ho già ricordato che ciò non è molto esatto: bisogna cercare qual'è la soluzione isotonica, che varia naturalmente col variare del sangue. Così s'è visto (§ 140) che per l'uomo ed i mammiferi superiori è di 0.9 ‰.

Se il tavolino del microscopio non è riscaldato, le alterazioni degli elementi sono visibilissime dopo un istante. Per fissare il sangue fresco si adoperano parecchie soluzioni. Ho già ricordate quelle del

PACINI (§ 140); HAYEM <sup>1)</sup> prende: sublimato 1 g., solfato sodico 10 g., cloruro sodico 2 g., acqua 400 cc. LÖWIT adoperava una soluzione concentrata acquosa di sublimato 5 cc., solfato sodico 5 g., cloruro 2 g., acqua 300.

**237. Sangue disseccato e colorato.** — Il metodo classico dell'EHR-  
LICH e di tanti altri osservatori è quello di disseccare la goccia di  
sangue stesa sul vetrino passandola sulla fiamma appena sia asciu-  
gata e poi colorandola. In questo modo gli elementi del sangue ri-  
sentono una temperatura di 110° ed anche 120° C., e mi pare ben  
difficile sostenere che ciò possa essere innocuo, e non produca delle  
alterazioni.

Ad ogni modo, per chi volesse seguire questo metodo, ecco le in-  
dicazioni precise, date da un autore recentissimo, che lo raccomanda  
per lo studio del sangue dei vertebrati, specialmente dei sauro-  
psidi <sup>2)</sup>. Distende su di un vetrino porta-oggetti, ben pulito, una  
goccia di sangue, in modo da ottenerne uno straterello sottile per  
quanto è possibile, e fa seccare rapidamente alla fiamma. Non bisogna  
esagerare nella sottigliezza dello strato di sangue, perchè il van-  
taggio che si avrebbe di una facile osservazione è bilanciato dal  
danno che il sangue, quando è preso e disteso in troppa piccola  
quantità, aderisce subito al vetro; quindi i globuli subiscono delle  
trazioni, e, per conseguenza, delle deformazioni, e possono anche es-  
sere lacerati in frammenti. Bisogna poi evitare che il sangue si  
asciughi da sè, con lentezza, perchè, in questo caso, tutti gli ele-  
menti, i nuclei specialmente, subiscono delle alterazioni. I granuli  
di cromatina si dissolvono e si fondono, producendo quelle figure  
che trassero in inganno EISEN <sup>3)</sup>. (Il quale lasciava asciugare len-  
tamente *all'aria per dodici ore, e poi spazzolava la superficie secca con  
un pennello!*).

Non è necessario passare successivamente in un liquido fissativo  
perchè il calore fissa di per sè, coagulando tutte le sostanze albu-  
minoidi; e dopo la coagulazione non sembra che i liquidi fissativi  
possano avere nessuna azione.

Per la colorazione si usa una soluzione satura in acqua distillata,  
riscaldata a bagnomaria, di blu di metilene B.X della *Badische Anilin-  
und Sodafabrik*. La soluzione non viene filtrata, perchè così si è sicuri,  
avendo colore in eccesso, che è satura. Si pone nel sangue una o  
due gocce di liquido, e si lascia agire per *un solo minuto primo*. Si

---

<sup>1)</sup> *Du sang et de ses altérations anatomiques*, Paris 1889, un grosso volume di oltre mille pagine; per i metodi tecnici vedi *Zeit. wiss. Mikr.*, 6. 1889, p. 330.

<sup>2)</sup> GIGLIO-TOS in *Memorie Accad. Sc. Torino*, 2. s. 48. 1898, p. 147 e *Zeit. wiss. Mikr.*, 14. 1897, p. 359.

<sup>3)</sup> *Proceed. Acad. Sc. California*, 3. S. Vol. I. 1897, p. 1.

lava abbondantemente con acqua distillata, finchè l'acqua rimane del tutto incolore. Così bagnato, il preparato è coperto col vetrino, avendo cura che non rimangano bolle d'aria. Si ripulisce il rimanente della lastra, si toglie con carta bibula tutto l'eccesso d'acqua della preparazione, finchè il vetrino rimane aderente, senza muoversi, alla lastra. Si luta con olio di oliva, per impedire il disseccamento e si osserva. Il preparato non dura molto, può servire solo per 2-3 giorni, ma è anche così facile rifarlo e in così breve tempo, che questo non può considerarsi come un inconveniente.

Il NIKIFOROW (1888) asciuga in fretta all'aria, agitando il vetrino, sul quale ha disteso la piccola goccia di sangue, e poi, invece di riscaldare, immerge nell'alcool assoluto ed etere solforico parti eguali, per 2-6 ore. Asciuga all'aria e colora con emallume e safranina (si può prendere anche emallume-eosina, emallume e fucsina acida, il liquido del BIONDI, ecc.). Si asciuga bene l'acqua, dopo lavato il colore, si passa alla fiamma, riscaldando leggermente, oppure si disidrata rapidamente nell'alcool assoluto. Poi xilolo e balsamo.

Recentemente il MASSLOW <sup>1)</sup> nel pulcino, nel cane e nel coniglio ha ottenuto migliori risultati dal metodo dell'EHRlich, che non da quello del NIKIFOROW, anche quando all'alcool assoluto ed etere sostituiva il sublimato  $\frac{1}{2}$  ‰ o il liquido del KULTSCHIZTKY 1897 (vedi § 47).

Questo gli ha dato i migliori risultati nella fissazione di piccoli pezzi di organi ematogeni, tenendoli nel liquido all'oscuro per 5-10 giorni. Per la colorazione usava ematossilina e orange G, ematossilina e fucsina acida, ecc.

Io non credo che nessuno di questi metodi sia da consigliare altro che per preparati scolastici; per delle ricerche citologiche essi sono senza dubbio molto grossolani.

**238.** Migliore certo è il metodo recente dell'ARNOLD <sup>2)</sup>. Egli lascia il sangue di rana per 24 ore nella soluzione osmica 1 ‰; poi, con una pipetta, leva il liquido fissatore sostituendo alcool assoluto, e così di seguito levandolo e sostituendolo alcool assoluto, alcool assoluto ed etere infine una soluzione poco densa di celloidina. Allora distende il tutto su di una lastra di vetro, in modo da formare uno straterello sottile; poco dopo mette la lastra in alcool debole 50 ‰, e così la celloidina si stacca, a foglia di sottile membrana, insieme col sangue; essa potrà essere quindi maneggiata, colorata, disidratata, tagliata in diversi

<sup>1)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 51. 1897, p. 137.

<sup>2)</sup> In *Arch. Patol. Anat. (Virchow's)*, 148. 1897, p. 470.

pezzi, per farne altrettanti preparati, rischiarata e messa nella resina.

Per evitare assolutamente il contatto con l'aria, è da consigliare il metodo dato dal BIZZOZZERO per la preparazione delle piastrine<sup>1</sup>. Si rade e poi si lava con cura la pelle dell'orecchio dell'animale nel tratto dove si vuol prendere il sangue e vi si appoggia sopra una goccia di questa miscela: acido osmico 1 % parti 1, cloruro sodico 0.8 % parti 3. Poi, con una lancetta, si ferisce un vaso sottostante, così che il sangue, quando esce, sia subito a contatto col liquido fissativo. La goccia si porta sulla lastra, e vi si adagia sopra il vetrino, il cui orlo è stato prima spalmato con olio di oliva; così, messo a posto, rimane impedita l'evaporazione e il movimento. Portato con riguardo sotto l'obiettivo, potrà essere osservato anche per lungo tempo.

**239. Colorazione del sangue.** — Parecchi colori abbiamo già indicati; molti altri vennero adoperati, quali il verde di metile, il violetto di metile, ecc.

BIZZOZZERO e TORRE (1880) coloravano a fresco aggiungendo alla soluzione fisiologica, qualche goccia di violetto di metile, o altro colore prima di deporvi la goccia di sangue.

LÖWIT (1891) fissava il sangue per due minuti nella soluzione di sublimato acquoso saturo, poi colorava con la soluzione concentrata del BIONDI. Servono anche la miscela triacida e quella per le cellule eosinofile dell'EHRlich (vedi § 94 e 100).

KNOLL<sup>2</sup> fissava con acido osmico 2 % per qualche minuto, lasciando disseccare lentamente, colorava col BIONDI, ed osservava in glicerina.

**240. Esame del sangue in circolazione.** — Si prestano bene diversi organi: l'estremità della coda e le branchie esterne delle larve di anfiabi; la membrana mesenterica, quella intergigitale o la lingua degli adulti.

Per la membrana mesenterica si adopera una tavoletta di legno dolce, che porta da una parte un foro circolare; l'anfibio viene assicurato vivo alla tavoletta<sup>3</sup>), appoggiato sul dorso, e quindi, con un taglio netto, si fa un'apertura nell'addome, per poter tirar fuori gli intestini. Così si fa arrivare un tratto di membrana mesenterica in corrispondenza del foro circolare: si fermano, con degli spilli, le

<sup>1</sup>) In *Arch. Ital. Biol.*, 16. 1892, p. 375 e 388.

<sup>2</sup>) *Sitz. Ber. Ak. Wien.*, 102. parte III, 1894, p. 441 e 105; parte III, 1896, p. 35.

<sup>3</sup>) Meglio fare un'iniezione sotto-cutanea, prima di legarlo, con qualche goccia di una soluzione 1 a mille di curaro, o d'idroclorato di morfina. Il RANVIER usava tagliare, colla punta di un coltello, il midollo spinale subito al disotto della testa.

anse intestinali, e si procede all'osservazione; per impedire il disseccamento bisogna continuare a inumidire gli organi estratti dal corpo con una soluzione salina 0,8 ‰.

Con maggiori precauzioni si potranno fare delle osservazioni anche su piccoli mammiferi. Si dovranno prima narcotizzare con una iniezione di morfina, poi bisogna radere il pelo dove si desidera fare il taglio; si lava con soluzione al sublimato, si taglia con coltello sterilizzato, si tirano fuori gl'intestini e si mette un tratto di membrana mesenterica sotto l'obiettivo, con l'avvertenza di tenere tutta la parte che s'è fatta uscire involta in garza, tenuta inumidita mediante una soluzione sterilizzata salina a 0.8-0.9 ‰, riscaldata a 37°-38° C. Il tavolino del microscopio deve pure essere tenuto alla stessa temperatura, se l'osservazione sarà protratta per qualche tempo.

La membrana alare dei pipistrelli è indicata dal BIZZOZZERO come la più adatta per l'esame del sangue in circolazione dei mammiferi. Infatti qui l'osservazione può esser fatta senza bisogno di alcuna operazione preliminare.

**241. Studio del sangue nel tessuto.** — Risultati molto più attendibili si avranno certamente dallo studio del sangue lasciato nell'interno dei vasi, nel tessuto; e quindi si presteranno gli organi o pezzi d'organi riccamente vascolarizzati che si possono avere da tutti gli animali e che sono numerosissimi. Asportato l'organo o il pezzo d'organo dall'animale vivente, e posto a fissare in un liquido energico, si potrà, con i soliti metodi già esposti, ottenere delle sezioni consecutive, sottili quanto si vuole, e nelle quali si potrà meglio che con gli altri metodi, studiare la struttura degli elementi del sangue. Questo sistema sarà certamente preferibile a quello così complicato escogitato dal BIONDI (1888) per fare sezioni di cellule del sangue, e si avrà il grande vantaggio di seguire con facilità la stessa cellula nelle sezioni successive.

Per la letteratura sulla tecnica del sangue nei vertebrati, vedi le opere dell'HAYEM e dell'ARNOLD già citate. Per gl'invertebrati, vedi i lavori del KNOLL già citati, e quelli del CUÉNOT<sup>1)</sup>. Parecchia bibliografia trovasi anche in un altro lavoro di GIGLIO-TOS<sup>2)</sup>.

**242. Colorazione differenziale dei globuli rossi e dei leucociti.** — Oltre a quelle già indicate (§ 239), è da raccomandarsi il metodo KULTSCHITZKY. I preparati a secco sono colorati con emallume o con emateina, quindi fucsina acida sciolta in acido acetico allungato,

<sup>1)</sup> In *Arch. Zool. expérim.*, 7. 1889, p. 1 e 9. 1891, p. 13 e *Arch. anat. micr.*, Paris. 1. 1897, p. 153.

<sup>2)</sup> *Mem. Acc. Sc. Torino*, ser. II, 47. 1897, p. 37.

poi eliantina (= orange III = metil-orange). I leucociti si colorano in giallo o ranciato, l'emoglobina prende un colore rosso vivo.

Col metodo FOÀ i preparati fissati con acido osmico 1 % si passano per 3-4 minuti in una soluzione acquosa allungata di blu di metilene, quindi per 5 minuti nell'acido cromatico 1 %. I leucociti rimangono incolori con il nucleo violetto, le emazie, di un bel colore verde smeraldo, hanno il nucleo blu.

Recentemente l'ASCOLI <sup>1)</sup>, per lo studio del sangue della lamproda, si è servito dei due metodi qui sopra indicati, facendo i preparati a secco del sangue in circolazione. Oppure anche colorava con ematossilina ed eosina. Per lo studio del sangue nel tessuto interstiziale del rene fissava piccoli pezzi dell'organo col liquido dello ZENKER.

TRAMBUSTI <sup>2)</sup>, per la distinzione fra i leucoblasti e gli eritroblasti nella midolla delle ossa di coniglio giovane, salassato ripetutamente, procede come segue:

Quattordici ore dopo l'ultimo salasso si estrae la midolla, che si fissa nel liquido del FLEMMING. Le sezioni si colorano per 24 ore in una soluzione all'1 % di tionina nell'acqua di anilina; dopo si scolorano con alcool cloridrico e si passano in una soluzione acquosa, e quindi in una alcoolica di eosina. Da questa nel xilolo, e si chiude nel balsamo.

I leucoblasti si distinguono benissimo dagli eritroblasti, anche durante la mitosi, perchè mentre questi ultimi mostrano un contenuto citoplasmatico omogeneo chiaro scolorato, i leucociti invece od i leucoblasti presentano costantemente delle granulazioni fortemente eosinofile.

**243. Preparazione delle piastrine.** — Serve opportunamente il metodo del BIZZOZZERO, indicato più sopra (p. 201), cioè l'estrazione di una goccia di sangue, ottenuta con la puntura dell'orecchio, che arriva nel liquido fissatore senza stare in contatto con l'aria. Per i trombociti, ritenuti dal GIGLIO-TOS analoghi, ma non omologhi, alle piastrine dei mammiferi, la preparazione sarà la stessa di quella che si usa per gli altri elementi del sangue dei vertebrati.

**244. Preparazione e colorazione della fibrina.** — Metodo di WEIGERT modificato da parecchi. Pezzi fissati in alcool assoluto sono tagliati, e le sezioni colorate con una soluzione nell'acqua di anilina di violetto di genziana. Serve la formula dell'EHRlich, già data (§ 80); si lava e si tratta per mezzo minuto col liquido del LUGOL (§ 51) o con un'altra qualunque soluzione di jodo e joduro potassico nell'acqua.

<sup>1)</sup> In *Atti dell'Accademia delle scienze di Torino*, 33. 1898.

<sup>2)</sup> In *Bulletins acad. Belgique*, 3. 33. 1897, p. 338.

Si torna a lavare, si asciuga con carta da filtro, si differenzia con olio di anilina e xilolo. Poi xilolo e balsamo. Invece del violetto di genziana, altri preferisce il violetto di metile 6 B.

**245. Materiale di ricerca.** — Ne ho già indicato parecchio nel corso di questo capitolo. Come dimensioni di elementi si prestano specialmente gli anfi. Emazie grandissime sono quelle del *Proteus anguineus*, che si può avere anche vivo ad un prezzo piuttosto elevato (un fiorino = lire 2.10, senza le spese di spedizione), scrivendo al custode della grotta di Adelsberg (Carnia, Austria).

### STUDIO DEGLI SPERMATOZOI.

**246. Esame a fresco.** — Sperma fresco può essere unito con la soluzione salina 0.9 ‰, ed esaminato subito; se la temperatura è elevata, o il tavolino riscaldato, gli spermatozoi dei vertebrati superiori saranno vivi anche dopo lungo tempo. Aggiungendo alla soluzione del blu di metile (qualche goccia della soluzione 1 a 300), si avranno presto ben colorati gli elementi.

**247. Macerazione.** — BALLOWITZ (1894) per macerare gli spermatozoi degli insetti (e suo fratello provò che il metodo valeva per gli artropodi in generale e per parecchi altri invertebrati), usava fissarli sulla lastra con i vapori dell'acido osmico per 5 minuti, dopo avere allungato lo sperma con la soluzione 0.6-0.7 ‰ di NaCl. Poi copriva col vetrino e conservava sotto una camera umida per alcuni giorni, quindi colorava con violetto di genziana. La soluzione salina scioglieva la sostanza cementante del flagello, e le fibre di esso si scorgevano ben distinte e separate.

Per gli spermatozoi dei mammiferi è un buon liquido macerante la semplice acqua distillata. I preparati vi si lasciano per diversi giorni, fino a 3 settimane, poi si lavano e si colorano. L'esame delle preparazioni viene fatto in glicerina.

**248. Conservazione degli spermatozoi.** — Il BALLOWITZ citato non consiglia il sublimato e neanche il liquido del FLEMMING, che non conservano bene gli elementi, specialmente quelli di forma molto allungata. Molto preferibile mescolare lo sperma con soluzione osmica 1 ‰ a parti uguali.

Come colorazione il violetto di metile sostituisce bene quello di genziana.

Anche il MEVES <sup>1)</sup>, per lo studio dello sperma maturo preso dal vaso deferente, adopera la fissazione con acido osmico 1 ‰, colorando

<sup>1)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 50. 1897, p. 137.



poi con la genziana per 24 ore o con la fucsina alluminica. I pezzi di testicolo (di *Salamandra*) sono fissati nell'HERMANN per due mesi e poi conservati nell'acido pirolegnoso; quindi imparaffinamento e sezioni di 6-10  $\mu$ . Colorazione con l'ematossilina ferrica secondo HEIDENHAIN, tenendo per 24 ore nella soluzione ferrica e per altre 24 nell'ematossilina. Qualche volta si colora dopo con la fucsina. Anche l'HERMANN <sup>1)</sup>, nel suo recentissimo lavoro sullo studio degli spermatozoi dello *Scyllium catulus (stellare)*, usa il suo liquido, oppure quello del FLEMMING, colora con l'ematossilina ferrica seguita anche da safranina, oppure fa una doppia colorazione con safranina e genziana.

Per gli spermatozoi del *Bombys mori*, anche il LA VALETTE ST. GEORGE <sup>2)</sup> fissa col FLEMMING e colora con la safranina.

**249. Studio della spermatogenesi.** — Si segue generalmente il metodo dei due che ci hanno dato alcuni fra i più importanti ed ormai classici lavori sull'argomento; cioè fissazione nel liquido di FLEMMING o nel liquido dell'HERMANN, di piccoli pezzi di testicolo, preso dall'animale vivente, nella stagione adatta. Poi colorazione con safranina, con violetto di genziana o con ematossilina ferrica dell'HEIDENHAIN, preceduta dal Bordeaux R.

Il NIESSING <sup>3)</sup> usa (oltre all'HERMANN) le due miscele di NIESSING G.: 1.° cloruro platinico 10 % parti 25, acido osmico 2 % parti 20, acido acetico glaciale 0,5 parti, H<sup>2</sup>O 50; 2.° come la precedente, ma invece di acqua distillata una soluzione acquosa concentrata di sublimato.

In generale gli istologi sono concordi nel ritenere che il sublimato non è il fissativo adatto, per lo studio della spermatogenesi e lo sconsiglia lo stesso HEIDENHAIN, che pure se n'è servito a lungo.

Il SOBOTTA <sup>4)</sup> dichiara che per la fissazione dei testicoli in generale le soluzioni concentrate acquose di sublimato con cloruro sodico danno risultati pessimi.

Ma recentemente il LENHOSSÉK <sup>5)</sup>, studiando la spermatogenesi nel topo (*Mus decumanus*), ha avuto buoni risultati, tanto dai liquidi del FLEMMING e dell'HERMANN, che servendosi di questa miscela: sublimato concentrato 75 cc., alcool assoluto 25 cc., acido acetico glaciale 5. I pezzi sono tenuti per 24 ore nel fissativo a 30°-35° C. Buoni risultati ha ottenuto anche dal sublimato concentrato e cloruro pla-

---

<sup>1)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 50. 1897, p. 276.

<sup>2)</sup> *Ibidem*, p. 756.

<sup>3)</sup> *Ibidem*, 48. 1896, p. 112.

<sup>4)</sup> *Ibidem*, 50. 1897, p. 21 in nota.

<sup>5)</sup> *Ibidem*, 51. 1897, p. 217.

tinico 1 % parti eguali, acido acetico glaciale.5 %. Colorazione con l'ematossilina ferrica, con la triplice colorazione del FLEMMING (saffranina, genziana e orange) od anche con la fucsina basica.

Io trovo che buoni risultati si hanno (almeno per gli anfi) servendosi del fissativo del MANN (§ 25) per 24 ore all'oscuro, secondo le norme date per i metodi APATHY (capitolo XXIV). Come colorazione si possono adoperare le più diverse sostanze ed i metodi speciali più sopra indicati.

MONTGOMERY FR. <sup>1)</sup>, per lo studio della spermatogenesi negli emitteri (*Pentatoma*, *Tropicoris*), fissa col liquido dell'HERMANN e e colora con saffranina e violetto di genziana. Il sublimato solo dà cattivi risultati; abbastanza buoni il sublimato acetico (100:5) e l'acido picro-acetico; ma il liquido dell'HERMANN è superiore a questi due.

**250. Materiale di ricerca.** — Tanto per gli spermatozoi che per la spermatogenesi, il materiale più adatto è fornito dagli anfi urodeli. Ma per lo studio degli anelli e delle tetradi è preferibile la rana. Fra gli artropodi si prestano bene a questo scopo la *Gryllotalpa* e il *Cyclops* <sup>2)</sup>.

### I PROTOZOARI.

**251. Generalità.** — Per l'esame a fresco, la macerazione, colorazione fissazione e conservazione vedi, in generale, quanto è stato detto nel cap. XIV e nei precedenti paragrafi, a proposito del *plankton* e delle preparazioni di singole cellule.

Per immobilizzare i protozoi servono alcune gocce di soluzione di cocaina o di idrocolorato di morfina, 1 a 10.000. Per rallentare i movimenti delle ciglia, è ottimo espediente condensare l'acqua nella quale vivono i protozoi con una soluzione di gomma. Viventi possono essere, se non veramente tinti, imbevuti nel succo cellulare di qualche colore, e si prestano le soluzioni allungatissime di blu di metilene e di congo neutro, che vengono sopportate bene dagli animali.

Per raccogliere molti protozoi da conservare in preparati permanenti, buono è il metodo dell'ARNOLD, già indicato per il sangue (§ 238).

**252. Studio degli infusori cigliati.** — Dobbiamo al MAUPAS delle ricerche importantissime sugli infusori cigliati; e dal suo la-

<sup>1)</sup> In *Zool. Jahrb., Abth. Anat.*, 12. 1898, p. 1.

<sup>2)</sup> Per lo studio dell'oogenesi, della maturazione dell'uovo e della fecondazione vedi i diversi paragrafi del capitolo seguente: *Embriologia dei metazoi*.

voro appunto (che sembra sconosciuto ai miei predecessori) prendo alcune indicazioni interessanti sul modo di conservare a lungo in vita colture d'infusori cigliati.

Occorrono, prima di tutto delle camere umide; ma quelle usate solitamente, una campana di vetro capovolta su di un piatto riempito d'acqua, contengono troppa aria, e quindi l'acqua delle preparazioni d'infusori evapora presto. Servono meglio dei vasi di circa 20 cm. di diametro, piani sul fondo e poco elevati, come per esempio le bacinelle che si adoperano in fotografia. Sul fondo si depone della sabbia fina e ben lavata, su questa si piantano due strisce di vetro collocate di taglio, e tali da restare 4-5 mm. più basse dell'orlo del vaso. Su queste se ne posano in piano e trasversalmente tre altre, larghe quella di mezzo 4-5 cm., quelle laterali 2 soli cm. Su queste si dispongono le lastre portaoggetti. Il tutto è ricoperto con una lastra che deve stare a contatto con l'orlo del vaso. Esso viene riempito d'acqua fin quasi a toccare le tre lastre che reggono i portaoggetti; in questo modo nella parte superiore si ha uno strato d'aria di pochissima altezza, 4-5 mm., e sempre saturo di umidità a cagione della sua vicinanza alla superficie liquida. Occorre sostituire l'acqua che evapora con *acqua piovana*, della quale si dovrà avere sempre una piccola provvista.

Per fare la scelta degli infusori, si prenderà una grossa goccia dell'acqua che li contiene per esaminarla, su di una lastra, al microscopio con un debole ingrandimento. Per prendere gli animali serve bene una pipetta di vetro lunga 10 cm., con la punta affilata avente un diametro di non oltre un millimetro di apertura; prima di servirsene, essa sarà inumidita facendovi passare un getto di acqua piovana. Ciò fatto, si osserva al microscopio l'infusorio da scegliere, si avvicina ad esso quanto più si può la punta della pipetta, nell'interno della quale salirà, per attrazione capillare, una gocchetta d'acqua, che verrà poi spinta sulla superficie d'un portaoggetti asciutto. Su questo si farà un secondo esame, per assicurarsi che l'animale desiderato c'è, e per esser certi che è solo, non con altre forme. In questo caso, più probabile, si ripeterà nello stesso modo la scelta portando su di un terzo portaoggetti la gocchetta presa con la pipetta. Sarà bene, fin dal secondo portaoggetti, aggiungere alla gocchetta una goccia di acqua piovana. Ripetendo l'operazione, si arriverà in breve a separare l'infusorio cercato. È importante lavare la pipetta con un forte getto d'acqua ogni qualvolta si è adoperata, perchè vi sono delle forme che aderiscono facilmente al vetro e che potrebbero poi inquinare la coltura. Le forme isolate si conservano sul portaoggetti, ricoperto di un vetrino; per questi ultimi una forma ed una dimensione opportuna è quella quadrata, col lato di 18 mm. Perchè il vetrino non aderisca alla

lastra, si terrà sollevato col mezzo di due pezzetti di quei grossi peli di crine che si adoperano per fare gli spazzolini da denti; tutto lo spazio sottostante al vetrino dev'essere completamente riempito d'acqua.

Bisogna aver cura che tanto le lastre come i vetrini siano *pulitissimi*. Meglio è tenere separato tutto il materiale che serve per queste colture (lastre, pipette, ecc.) e non adoperarlo per altri scopi.

Per poter mantenere a lungo in vita le colture d'infusori, bisogna dare ad essi il nutrimento necessario; e, secondo che sono carnivori od erbivori, bisognerà fornire ad essi o altre specie di infusori o degli schizomiceti. Per i primi occorre avere una forma piccola, facile ad allevare e comune. Queste qualità sono possedute dal *Cryptochilum nigricans*, un piccolo cigliato erbivoro, comune in tutte le acque stagnanti; basterà dunque fare delle infusioni con avanzi di vegetali presi nelle acque stagnanti per essere sicuri di ottenerne moltissimi dopo pochi giorni. Ora si tratta di averne delle colture abbondanti per poter nutrire gl'infusori carnivori. A questo scopo si prende qualche pizzico di fieno e lo si mette in infusione nell'acqua, quindi si riscalda per alcuni minuti a 60° C.; rimangono così distrutte le specie estranee, ad eccezione della *Colpoda cucullus* che, se incistata, non muore certo a temperatura così bassa. Ma essa sparirà ben presto, per lasciar posto ai *Cryptochilum*.

L'infusione di fieno raffreddata è abbandonata a sè stessa per 2-3 od anche 4 giorni, finchè gli schizomiceti vi si sviluppano in quantità. Allora vi si seminano alcuni *Cryptochilum*, assicurandosi che non s'introducono contemporaneamente altri infusori. L'infusione sarà tenuta sempre ben coperta con una lastra aderente esattamente all'orlo del vaso. In questi piccoli acquari i *Cryptochilum*, essendo soli e provvisti di nutrimento abbondante, si moltiplicano a miriadi. Quando le colture cominciano ad esaurirsi, potranno essere ravvivate mettendovi dei pezzetti di midolla di pane, ma in piccola quantità. Ad ogni modo, dopo un certo tempo, l'esaurimento della colonia sarà completo: bisognerà quindi avere provveduto antecedentemente a fornirsi di un altro vivaio simile.

Quando si vuole dar da mangiare a degli infusori carnivori, si dovrà prendere una goccia d'infusione con dei *Cryptochilum*, metterla su di una lastra ed esaminare se è inquinata da altre forme; in tal caso queste ultime saranno eliminate estraendole con una pipetta nel modo già indicato. Si possono fare delle preparazioni di *Cryptochilum* pure, secondo le norme sopra date, e tenerle nella camera umida per aver una provvista nutritiva. Con una pipetta si aspira una gocciola di tali infusori e la si depone vicino all'orlo del coprioggetti degli infusori che devono essere alimentati,

Anche il *Colpidium colpoda* potrebbe essere allevato facilmente e dato per nutrimento ai carnivori più grandi e più forti.

Le specie erbivore si nutrono con farina di grano cotta. Un pizzico di farina è mescolato con una grande quantità d'acqua piovana e questa è fatta bollire per due o tre minuti. Con questo alimento si possono nutrire facilmente i *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucoma*, *Vorticella* e perfino le *Stylonichia* che sono contemporaneamente carnivore ed erbivore.

L'infusione di farina dev'essere rinnovata spesso, perchè fermenta facilmente ed inacidisce.

**253. Fissazione e preparazione d'infusori.** — Per lo studio della coniugazione e del nucleo il MAUPAS <sup>1)</sup> s'è servito di questo metodo: uccisione e fissazione col sublimato 1 a 100, si lava con acqua e poi si colora con verde di metile nell'acido acetico 2 %; si rischiarà e si conserva il preparato nella glicerina. Questo, dopo molte ricerche, è il procedimento più sicuro, esatto e rapido per lo studio dell'apparecchio nucleare, sia durante il riposo che in cinesi.

**254. Nuclei di protozoi.** — CALKINS <sup>2)</sup> fissa protozoi appartenenti a diverse classi, con sublimato acquoso più 5 % di acido acetico, con acido picro-acetico, col liquido dell'HERMANN o col sublimato solo. Per la colorazione preferisce l'ematossilina ferrica o la triplice colorazione del FLEMMING. I nuclei vengono studiati sui protozoi *in toto*, ma meglio su sezioni sottili.

Per lo studio del nucleo nella coniugazione del *Colpidium colpoda* l'HOYER <sup>3)</sup> fissa gl'infusori messi in una provetta con una miscela di sublimato 5 % parti 1 e bicromato potassico 3 % parti 2. Queste proporzioni, buone per il *Colpidium*, dovranno probabilmente variare ed essere determinate empiricamente per altri cigliati. Dopo la fissazione si lava a lungo con acqua, finchè il color giallo è scomparso, quindi si passa negli alcoli e s'imparaffina il sedimento, facendo delle sezioni di 4  $\mu$ . Per la colorazione si trattano le sezioni con ematossilina EHRlich e poi col liquido del BIONDI; così gli elementi cromatici sono blu o violetto, quelli acromatici rosei. Anche l'ematossilina ferrica dà buoni risultati.

<sup>1)</sup> In *Arch. zool. expérim.*, pag. 224.

<sup>2)</sup> In *Annals New-York Acad. Sc.*, 11. 1898, p. 381.

<sup>3)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 55. 1899, p. 97.

## CAPITOLO XXII.

## Embriologia dei metazoi.

**255. Generalità.** — Qui i metodi tecnici sono diversi a seconda degli animali; bisogna dunque trattare separatamente dei diversi gruppi, ma prima devo accennare ad alcuni argomenti che si riferiscono a tutti.

Il liquido fissativo adoperato più largamente ed in uso ancora oggidi è quello del KLEINENBERG. La fama che giustamente s'era acquistata l'autore, e forse anche la moda, che ha pur negli studi severi più importanza di quel che si potrebbe credere, influirono molto nel diffondersi di un metodo di fissazione ch'io non reputo certamente il migliore, e ne ho già dette le ragioni (§ 30). Vero è che anche l'acido picro-solforico, e quindi il liquido del KLEINENBERG, hanno dei vantaggi, in quanto che, tendendo a gonfiare e a rammollire il tessuto connettivo, facilitano poi la penetrazione dell'alcool, che deve seguire immediatamente il fissativo. Si ha così anche il vantaggio di poter fare più facilmente le sezioni appunto per la minor durezza del connettivo e del tessuto muscolare. Si veda, inoltre, quanto ho detto nel § 231.

Lo scopo della miscela del RABL (§ 26), di acido picrico e sublimato, è appunto quello di correggere i difetti dell'uno con le proprietà dell'altro. Ma non va dimenticato che l'acido picrico, e tutti i fissativi dei quali fa parte hanno l'inconveniente di esigere un gran consumo di alcool, se si vuol togliere il color giallo.

Per disegnare embrioni a piccolo ingrandimento HIS ha proposto un apposito strumento, l'*embriografo*<sup>1)</sup>, il quale rende effettivamente dei buoni servizi, ma che può essere sostituito dalla camera chiara ABBE (vedi § 7) applicata al microscopio semplice del MAYER.

**256. Osservazione delle uova.** — Valgono in genere le indicazioni già date al § 229. Il liquido migliore per l'osservazione *in toto* delle uova, quando è necessario di rendere trasparente il vitello, è certamente quello proposto dal WILSON (1892); glicerina, acqua e acido acetico glaciale a parti eguali, oppure il liquido del CALBERLA (§ 141) od anche quello del SAMASSA (glicerina, alcool, acido acetico glaciale, parti eguali). Le uova possono venire conservate in questi liquidi per diversi giorni, senza che ne risentano danno.

Per conoscere l'epoca della presenza di prodotti sessuali maturi e di larve libere degli animali marini, è necessario consultare l'im-

<sup>1)</sup> His W. *Anatomie menschlicher Embryonen*, Leipzig, 1880, p. 8.

portante lavoro del LO BIANCO, del quale si è pubblicata ora la seconda edizione <sup>1)</sup>.

**257. Osservazione a fresco.** — Per l'embriologia, specialmente degli animali inferiori, ha una grande importanza lo studio a fresco sul vivo, che si può fare facilmente perchè in generale le uova sono molto piccole. Ma sovente esse sono contenute dentro a bozzoli od a capsule non trasparenti, ed allora la cosa è molto più difficile, perchè è necessario liberarle dal rivestimento. Talvolta sono completamente immerse in una sostanza albuminosa ed allora bisogna cercare d'isolarle, per poterle anche colorare. Del resto, questa operazione è necessaria anche per avere una buona fissazione, oppure quando si vogliono conservare le uova per qualche tempo nel liquido del WILSON.

### EMBRIOLOGIA DEI CELENTERATI.

**258.** Appunto per la facilità di tener vive le uova e le larve di quasi tutti i metazoi più bassi, e per la possibilità di mantenerle in liquidi così detti indifferenti, colorandole anche, non abbiamo molte indicazioni tecniche sul modo di fissarle e sezionarle. E rari accenni di tecnica si trovano nella letteratura dei *Poriferi* e dei *Celenterati*.

Il MAAS (1894) per le uova e larve di spugna preferisce il liquido del FLEMMING o dell'HERMANN fatto agire per 1-4 minuti. Colorazione poi col violetto di genziana e orange G.

Il KOCH <sup>2)</sup>, per lo sviluppo della *Caryophyllia cyathus*, fissa con sublimato, poi decalcifica, taglia e colora le sezioni.

SMITH (1891), per lo sviluppo dell'*Aurelia*, fissa con acido picrico (§ 54) e passa poi nell'alcool a 90 %.

Se si vogliono conservare le forme di questi ed altri celenterati, si vedano i metodi di LO BIANCO; vedi anche più avanti: preparazione di organi e tessuti di animali invertebrati.

### EMBRIOLOGIA DEI VERMI.

**259. Trematodi, cestodi.** — Fissazione delle uova con acido osmico 1 %, ecc. (VAN BENEDEN 1881, COE 1896).

**260. Turbellari.** — Fissazione con alcool assoluto e acido acetico a parti eguali (GARDINER 1895); ma dubito, per le ragioni già dette (§ 34), che questo liquido dia buoni risultati, e reputo preferibile il

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 13. 1899, p. 448.

<sup>2)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1896, p. 755.

sublimato acido e quello alcoolico-acido. Per la *Jungia* ho già indicato (§ 230) il liquido del GILSON e quello del CARNOY e LEBRUN (1897).

VAN DER STRICHT <sup>1)</sup>, per lo studio della formazione dei globuli polari del *Thysanozoon*, ha adoperato come fissativi il liquido del FLEMMING o quello dell'HERMANN, fatti agire per non meno di 10 giorni, ed anche il sublimato.

Una grave difficoltà che s'incontra è quella di far penetrare il cloroformio dopo l'alcool assoluto. Ciò non si ottiene che a condizione di fare una disidratazione rapidissima, 1-2 minuti, cambiando una volta l'alcool assoluto. Dopo ciò, si versa a goccia a goccia il cloroformio nel tubo che contiene le uova, con un poco di alcool assoluto, e quindi si toglie a poco a poco la miscela, sostituendo sempre nuovo cloroformio.

Anche l'imparaffinamento dev'essere fatto con rapidità, in modo che dopo 20-30 minuti l'operazione sia compiuta.

La colorazione si fa sulle sezioni, e con i primi due fissativi si adopera la safranina, scolorando con alcool acidulato con acido picrico; le sezioni fissate in sublimato si colorano col liquido del BIONDI o con l'ematossilina ferrica.

**261. Rotiferi.** — Acido osmico 1 % od anche liquido del FLEMING, poi si scolora col metodo MAYER (§ 157) (JENNINGS 1896).

**262. Nemertini.** — Nè il BÜRGER (1895), nè il LEBEDINSKY <sup>2)</sup> parlano della tecnica adoperata. Certamente i *Pilidium* si fissano bene nel sublimato acetico. In generale la fecondazione artificiale nei nemertini non riesce; fa eccezione il *Cerebratulus marginatus*, del quale si potette avere tutto lo sviluppo dell'uovo fino alla larva (*Pilidium*).

COE <sup>3)</sup> fissa le uova di *Cerebratulus* col sublimato acetico o col liquido del BOVERI, per 4 ore. Poi lascia per parecchi giorni nell'alcool al 70 %, cambiato ripetutamente. Involge le uova in un lembo staccato dall'epidermide di qualche anfibio, quindi imparaffina. Sezioni sottili, 3-6  $\mu$ , colorazione per 12-24 ore in una soluzione forte di Bordeaux R, quindi con l'ematossilina ferrica.

**263. Nematodi.** — Moltissimi reagenti furono usati per lo studio delle uova di *Ascaris megalocephala*, ma, come ho già rilevato (§ 230), spesso si errò nell'adoperarli, perchè le uova rivestite d'un guscio resistente non si lasciano fissare che da liquidi molto energici e penetranti. Certamente le figure cariocinetiche dei preparati di CARNOY

<sup>1)</sup> In *Arch. Biol.*, 15. 1898, p. 369.

<sup>2)</sup> *Arch. Mikr. Anat.*, 49. 1896, p. 503.

<sup>3)</sup> In *Zool. Jahrb.*, 12. 1899, p. 427.



e LEBRUN (1897) sono molto belle, e vennero ottenute adoperando come fissativo o il liquido del GILSON, o il cloroformio, alcool assoluto ed acido acetico glaciale a parti eguali, sublimato 5 % lasciato agire per 10 minuti, dopo alcool, ecc. Ma ho già detto nel § 230 i difetti di questo fissativo. La colorazione preferita dai due autori era quella con l'ematossilina ferrica HEIDENHAIN (vedi anche § 75).

Esemplari viventi si potranno avere dai veterinari dei pubblici macelli; l'*Ascaris megaloccephala* vive nell'intestino del bue e del cavallo.

STRASSEN (1896) si è servito dell'alcool a 96 % 4 parti, acido acetico 1 parte, poi alcool forte, ecc. ZOJA (1896), per lo studio delle uova *in toto*, metteva il pezzo di utero nell'alcool assoluto parti 5, acido acetico glaciale parti 1, per 24 ore; poi passava in una soluzione acquosa satura e filtrata di bruno di Bismarck per 48 ore, poi glicerina allungata, quindi glicerina pura; qui le uova si conservano bene per dei mesi. Anche ERLANGER (1897) preferiva per la fissazione le forti soluzioni alcoolico-acetiche e picriche; ma l'esame dei suoi preparati mi ha convinto che la fissazione era tutt'altro che buona e che le uova erano molto, ma molto contratte.

Una grave difficoltà, che presentano le uova di *Ascaris*, consiste nella presenza della grossa e dura capsula, che lascia penetrare poco il fissativo, ed offre una grande resistenza quando si vogliono fare le sezioni dalla paraffina, perchè il calore rende ancor più duro e friabile il guscio. KOSTANECKI e SIEDLECKI (1896) trasportavano dall'alcool forte alla miscela: alcool assoluto parti 2, cloroformio parti 1; e poi: alcool assoluto parti 1, cloroformio parti 2; quindi puro cloroformio. Qui ponevano dei pezzetti di paraffina tenera (48° C.) fino a saturazione a freddo, poi trasportavano nella stufa a 30° C., e poi a 40°, aggiungendo paraffina al cloroformio, e via via finchè arrivavano alla paraffina pura a 52° C. Qui imparaffinavano. Ma gli stessi autori dichiarano che le uova si contraevano [ed anche si deformavano, come si scorge dall'esame delle due tavole che accompagnano il lavoro].

CARNOY e LEBRUN hanno adoperato, per il rivestimento, di preferenza la celloidina, che penetra lentamente, e solo cominciando con soluzioni molto allungate; per un buon incelloidinamento occorrono in tutto due mesi. Ciò nondimeno succede, quando si taglia, che delle uova nuotano nel liquido (l'alcool impiegato per tagliare), non essendo la celloidina penetrata ovunque entro il guscio. Bisognava, in questo caso, lasciar asciugare la superficie del taglio e stendervi un sottile strato di collodio liquido; così ottenevano buone sezioni di 6 e 10  $\mu$ . È preferibile questo rivestimento a quello con la paraffina, perchè il calore guasta le uova. Nel caso si voglia fare l'imparaffinamento, si deve prendere paraffina molto tenera, lasciare

le uova non più di un minuto e mezzo nella paraffina fusa e poi tagliare le sezioni in un luogo fresco.

**264. Irudinei.** — Per la fissazione occorrono metodi diversi, secondo che si ha da fare con uova con molto o scarso vitello. Nel primo caso (*Clepsina*) si hanno buone fissazioni con questa miscela: sublimato acquoso concentrato, acido picrico soluzione acquosa satura ed acido acetico al 15 % a parti eguali. Le uova vi si lasciano per 12-24 ore, non più. Poi si passano subito nell'alcool a 96 % puro, e vi si lasciano per 24 ore, quindi nell'alcool jodo-jodurato, per levare il sublimato. Nelle uova di *Hirudo*, *Pontobdella*, ecc., con scarso vitello, bisogna prima isolare le uova, aprendo la capsula e separandole dall'albumina dalla quale sono involte.

Per la fissazione delle uova è buona la miscela di sublimato ed acido osmico a parti eguali (vedi maggiori indicazioni nei metodi dell'APÀTHY per lo studio del sistema nervoso al capitolo XXIV).

Si presta pure, specialmente per *Nepheles*, per dare buone preparazioni *in toto*, il liquido del CARNOY (1884): acido acetico glaciale ed alcool assoluto a parti eguali. Si può anche prendere: sublimato acquoso concentrato parti 4, acido acetico glaciale parti 1. Dopo un quarto d'ora si passa nel sublimato alcoolico, quindi nell'alcool a 96 %, poi nell'alcool jodo-jodurato. Per le preparazioni *in toto*, buone colorazioni dà il paracarminio. Embrioni più avanzati di *Clepsinidi* si fissano meglio con sublimato ed acido osmico, ma diminuendo la forza della soluzione osmica a 1 ‰<sup>1</sup>).

**265. Oligocheti.** — È noto che per l'embriologia del comune lombrico il KLEINENBERG introdusse nella tecnica il liquido che porta il suo nome, e del quale ho già fatto parola (§ 30). In un più recente lavoro del WILSON (1889) il liquido del PERÉNY è giudicato superiore a tutte le miscele osmiche, al sublimato, all'acido picro-solfonico. Si veda, del resto, quanto è detto più sotto a p. 216; ho ragione di credere che oggidì il WILSON abbia cambiato di parere. Gli embrioni venivano lasciati nel fissativo per 15 minuti al minimo, e fino ad 1 ora, poi passati nell'alcool a 70 % per 24 ore; quindi in quello a 90 %.

**266. Policheti.** — Il KORSCHOLT (1895) fissa le uova di *Ophryotrocha* nel liquido del BOVERI (soluzione satura di acido picrico allungata col doppio di acqua e acidulata con 3 % di acido acetico).

WILSON (loc. cit.), per la *Nereis*, preferisce o il liquido del PE-

---

<sup>1</sup>) Devo alla cortesia del prof. S. APÀTHY, che da parecchi anni sta lavorando intorno ad una monografia degli Irudinei, queste notizie, non ancora pubblicate, sulla tecnica da lui adoperata per le ricerche embriologiche. E colgo quest'occasione per esprimergli i miei ringraziamenti.

RÉNY, o quello del FLEMMING, per 10-30 minuti. Invece il WISTINGHAUSEN (1891), per la stessa *Nereis*, adopera il sublimato acetico o il liquido del FLEMMING allungato, quest'ultimo specialmente per gli embrioni più avanzati.

EISIG <sup>1)</sup> fissa le uova e le larve delle *Capitella* nel sublimato in acqua di mare (5 ‰), al quale aggiunge, al momento di servirsene, 25 ‰ di acido acetico glaciale. Poi trasporta in alcool 50, 70, 90 ‰. Non colora con soluzioni acquose, ma con l'emacalcio del MAYER più fortemente acidulato (5 ‰ di acido acetico), e, quando è troppo colorato, passa nell'alcool con 2 ‰ di nitrato d'alluminio. (Questa scolorazione può esser fatta anche sulle sezioni). Occorrendo colorazione plasmatica, si serve di una soluzione di eosina nell'alcool a 90 ‰.

Buon materiale citologico si ha, secondo WILSON, dalle uova di *Aricia foetida*.

**267.** Per le uova di *Myzostoma* il KOSTANECKI <sup>2)</sup> fissa o col sublimato alcoolico, acidulato con acido acetico, o con acido nitrico, oppure si serve del liquido del PERÉNY o di quello del BOVERI; oppure dell'acido nitrico al 3 ‰, quindi alcool, alcool e cloroformio, paraffina, ecc. Le sezioni di 5  $\mu$  sono colorate con l'ematossilina ferrica, secondo HEIDENHAIN, e quindi Bordeaux.

WHEELER <sup>3)</sup> toglie le uova dall'utero e le porta in un vetro da orologio, le studia a fresco, se occorre, colorandole con carminio acetico. Fra i molti fissativi, il solo che dà buoni risultati è la soluzione *debole* del FLEMMING (§ 32). Si versa lentamente nell'acqua di mare, dove sono contenute le uova; queste si fissano e aderiscono al fondo del vetro da orologio; ivi, con un po' di pazienza, si mantengono anche facendo i lavaggi in acqua ed i passaggi fino all'imparaffinamento. Non è difficile staccare il materiale imparaffinato dal fondo del vetro.

Le sezioni si fanno di 5  $\mu$ , o, al più, di 7  $\frac{1}{2}$ . La colorazione preferibile è l'ematossilina ferrica.

**268. Echinodermi.** — Tanto per gli *Ofuridi*, che per le *Holoturie*, RUSSO adopera l'acido osmico 1 ‰, per 2 ore, e poi fa seguire il liquido del MÜLLER per una settimana od anche più, così (se è il caso) si decalcificano le larve, quindi alcool a 30 ‰. Egli reputa questa fissazione superiore a quella con sublimato alcoolico-acetico (75, 25, 5 cc., rispettivamente), che dà pure buoni risultati.

Per lo studio delle uova di *Echini*, vedi i vecchi lavori degli HERT-

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel.* 13. 1898, p. 89.

<sup>2)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 51. 1898, p. 463.

<sup>3)</sup> In *Arch. Biol.*, 15. 1897, p. 2.

WIG e del FOL. In uno più recente il WILSON (1895) preferisce il sublimato acetico a tutti gli altri fissativi; ed è importante tener conto della sua opinione, non solo perchè è quella di un ricercatore coscienzioso, ma anche perchè essa diventa più notevole quando si pensa che quasi tutti i lavori americani di embriologia di quest'ultimo decennio furono fatti o con l'acido picro-solforico o col liquido del PERÉNY! Le sezioni venivano colorate con l'ematossilina ferrica, alla quale si faceva seguire o il congo o la fucsina acida.

È inutile aggiungere che anche per le uova e larve di echinodermi ha grande importanza lo studio sul vivo ed a fresco nell'acqua di mare. Questo è il metodo usato di recente dal REINKE <sup>1)</sup>, servendosi anche dell'azione di un compressore. Per la conservazione questi ha adoperato gran numero di fissativi, e per la colorazione la miscela del BIONDI, l'ematossilina ferrica dell'HEIDENHAIN, ecc.

Credo inutile ricordare che le uova degli *Echini* costituiscono un materiale prezioso per gli studi citologici.

**269. Briozoi.** — BRAEM (1890) fissa gli statoblasti di *Cristatella*, per studiare lo sviluppo degli embrioni, per 10 minuti nella soluzione concentrata di sublimato a caldo, poi alcool.

#### EMBRIOLOGIA DEGLI ARTROPODI.

**270. Copepodi.** — VOM RATH (1895) fissa le uova con l'acido picrosmicacetico (§ 29) e colora con saffranina ed emateina sulle sezioni. Buoni risultati danno anche le altre miscele, già ricordate (§ 27), dell'autore.

**271. Ostracodi.** — Per lo studio delle uova di *Cypris* il WOLTEREK <sup>2)</sup> ha i migliori risultati dal sublimato picro-acetico di VOM RATH (acido picrico, soluzione concentrata, 100 cc.; sublimato, soluzione acquosa concentrata, 50 cc.; acido acetico glaciale 2,5-5 cc.). Per la colorazione, oltre alle solite soluzioni di carminio e di ematossilina, adopera l'ematossilina ferrica.

**272. Anfipodi.** — DELLA VALLE (1893) poneva le uova di *Orchestia* in una soluzione acquosa concentrata di sublimato bollente, poi le toglieva subito con una pipetta, per trasportarle nell'acqua di mare fredda, e da qui nell'alcool debole, ecc. Se le uova sono ben fresche, si ha il vantaggio che spesso la capsula si spacca da sè, oppure (se si tratta di fasi di sviluppo più avanzate) fra l'embrione e la capsula stessa si raccoglie una certa quantità di liquido, cosicchè è facile, con gli aghi, bucarla e poi levarla senza far danno.

<sup>1)</sup> In *Sitzber. Akad. Wiss.*, Berlin, 1895, p. 625.

<sup>2)</sup> In *Zeit. wiss. Zool.*, 64. 1898, p. 601.

**273. Limulus.** — KINGSLEY (1892) riscalda le uova nell'acqua di mare a 70°-75° C., e le trasporta nell'alcool debole. Nei primi stadi, a cagione della durezza della capsula, preferisce di rivestire con celloidina; più tardi adopera la paraffina. KISHINOUE (1893) adopera lo stesso metodo, ma, per assicurarsi della penetrazione dell'alcool, buca il corion, passa in alcool forte e fa il rivestimento misto in celloidina-paraffina.

**274. Decapodi.** — Nel suo notissimo lavoro sull'*Astacus fluviatilis* REICHENBACH (1886) procedeva alla fissazione delle uova ponendole, freschissime, in un matraccio, dove era grande quantità di acqua riscaldata a 60°-70° C., e qui non di rado la capsula si rompeva; quindi trasportava per 24 ore nel bicromato potassico a 1-2 % o nell'acido cromico a 0.5 %, poi lavava nell'acqua per 24 ore e trasportava nell'alcool, ecc.

Il MAYER, per le uova di *Palinurus*, raccomanda l'acido picronitrico.

**275. Tardigradi.** — ERLANGER (1895) fissava le uova, ed anche gli animali, o nel liquido del FLEMMING, o nell'acido picro-solforico, al quale aveva aggiunto 1 % di acido osmico all'1 %, oppure nella miscela sublimato concentrato acquoso 4, acido acetico 1. Nelle prime due soluzioni le uova si annerivano e venivano scolorate con acqua ossigenata.

**276. Scorpionidi.** — BRAUER (1894) fissava le ovaie, se le uova erano ancora piccole, per un'ora nel liquido del FLEMMING; poneva gli embrioni più avanzati, prima, per un minuto e mezzo nell'acqua calda, poi per 10-20 minuti nel liquido del FLEMMING, o per 2-6 ore nell'acido cromico a 0,2 %. E nel fissativo toglieva l'epitelio dell'ovario.

**277. Falangidi.** — HENKING (1886) fissava le uova in acqua bollente o nel liquido del FLEMMING freddo, induriva nell'alcool a 90 % e poi conservava in quello a 70 %; qui poteva facilmente liberarle dalla capsula con degli aghi.

**278. Araneidi.** — KISHINOUE (1891): acqua calda a 70-80° C., poi alcool a 70 %; 24 ore dopo si fora la capsula e si mette in alcool forte.

**279. Insetti.** — PATTEN (1884) pone le uova o le larve di *Blatta* nell'acqua fredda che riscalda fino a 80° C.; quando è fredda, trasporta nell'alcool a 20 % e poi via via in quelli più forti. WHEELER (1880) libera le uova dall'ovario nella soluzione fisiologica e fissa col liquido del PERÉNY per un quarto d'ora, poi in alcool. Le uova deposte sono trattate col metodo del PATTEN, oppure ponendole nell'acido picro-solforico per dieci minuti e poi nell'alcool. HEYMONS (1891) fora la capsula ad un'estremità, passa per due minuti nell'acqua a 90° C., e quindi nel liquido del FLEMMING. Per le larve, questo stesso fis-

sativo, oppure il sublimato. HENKING (1891) uccide con l'acqua calda e passa nell'alcool. Pure riconoscendo che questo è il solo metodo che si possa usare generalmente, egli trova che non dà risultati molto buoni per le ricerche citologiche. Molto preferibile è la soluzione del FLEMMING per mezz'ora (beninteso a freddo), e poi per due ore nella stessa miscela allungata con tre volumi d'acqua; poi si lava, si passa in alcool, ecc. L'acido picro-acetico del BOVERI non attraversa le membrane. L'acqua di JAVELLE (e quindi anche quella del LABARRAQUE) per rammollire le membrane dell'uovo non è da consigliare.

Siccome la più grande difficoltà nel fare le sezioni è presentata dal vitello friabile, così l'HENKING, dopo la fissazione e il passaggio nell'alcool, buca il corion, colora con carminio boracico e quindi mette le uova colorate in 20 cc. di alcool a 70°, al quale si è aggiunta una goccia di HCl concentrato e la punta di un coltello di pepsina. Le uova sono quindi passate negli alcoli, rischiarate e imparaffinate. Salvo qualche eccezione (il *Bombyx mori*, ad esempio), si lasciano sezionare facilmente. Per l'esame a fresco le uova si tengono in questa miscela: acqua distillata 80 cc., glicerina 16 cc., acido formico 1 cc., acido osmico (1 %) 1 cc., Dahlia grammi 0,04. Volendo conservare il preparato, basterà lutare il vetrino. [Ma io reputo più opportuno, dopo il trattamento con questa miscela, sostituirla con glicerina sola e poi con glicerina gelatina; oppure sciroppo di APÀTHY; od anche servirsi del metodo che ho indicato al § 166 e fare il preparato permanente].

BENGTSSON <sup>1)</sup>, per la larva di *Phalacrocera*, ha trovato che il miglior fissativo è il sublimato alcoolico a caldo, secondo la formula del FRENZEL (§ 48). L'acqua di JAVELLE, per rammollire la chitina non ha mai dato buoni risultati.

BRIÛEL <sup>2)</sup>, adopera, per le larve e le pupe, l'alcool assoluto (deve essere assolutamente anidro), con un pochino di sublimato, riscaldato a 70°-75°C.

LÉCAILLON <sup>3)</sup> fissa le uova di coleotteri con la miscela dello ZENKER (§ 52), fortemente acidulata con acido acetico e riscaldata a 40° C. per 24 ore. Poi colora le sezioni con emallume:

**280. Riassunto dei metodi embriologici sugli artropodi.** — In un punto sono concordi nella grande maggioranza gli autori: nella necessità del calore per avere una buona fissazione; e tanto più che

<sup>1)</sup> In *Handl. Fysiogr. Sällsk. Lund* (2) 8. 1897, citato dal MAYER nel *Lee-Mayer*, p. 420.

<sup>2)</sup> In *Zool. Jahrb. Morph. Abth.*, 10. 1897, p. 569.

<sup>3)</sup> *Arch. Anat. Micr.*, Paris, 1. 1897, p. 208.

talvolta per suo mezzo si può avere anche la rottura del guscio, pur non recando danno all'embrione. È ovvio che, piuttosto che riscaldare le uova nell'acqua, per poi metterle nel fissativo a freddo, sarà più opportuno riscaldare a 70°-80° C. quest'ultimo e versarvi le uova. Dopo pochi minuti il recipiente sarà tolto dal fuoco, o dal bagnomaria, in modo che il liquido, con le uova contenutevi, si raffreddi a poco a poco.

I vecchi osservatori facevano uso dell'acqua di JAVELLE o di quella del LABARRAQUE per rammollire il guscio; ma i più recenti e i più accurati sono contrari a questi metodi, che alterano la struttura cellulare. Anche il metodo di HENKING per tagliare facilmente il vitello (digestione artificiale) non lo reputo consigliabile; del resto non riesce assolutamente in molti altri casi, negli ortotteri per esempio, oltre che nel *Bombyx*, ricordato dall'A.

I liquidi fissativi preferiti erano specialmente l'acido picrico, il picro-solforico e il liquido del KLEINENBERG, a cagione della grande penetrabilità. Quanto al picro nitrico del MAYER, suggerito da qualcuno, è da evitare; ma anche i due ultimi dei tre sopra nominati non credo siano da consigliare. E l'acido picrico verrà adoperato non da solo, ma in compagnia del sublimato. Quest'ultimo nella soluzione acquosa concentrata e meglio con 5 % di acido acetico è pure un buon fissativo. Beninteso che anche questi vanno usati a caldo (70°-80° C.) per pochi minuti, e poi lasciati agire raffreddando. Le soluzioni osmiche non sono da raccomandare, perchè col calore si decompongono, e l'acido osmico svapora rapidamente. Se si credesse di servirsene bisognerà limitare il riscaldamento a 35°-40° C. dentro un recipiente ben chiuso e per poco tempo (mezz'ora), e poi continuare l'azione del fissativo a freddo. Il sublimato alcoolico e l'alcool assoluto sono da evitare; induriscono troppo rapidamente e raggrinzano, rendendo anche le uova molto friabili. Piuttosto, quando si credesse necessario aumentare la penetrabilità del sublimato, si potrebbe ricorrere al liquido del GILSON (§ 23). Anche il liquido del PERÉNY si dovrà evitare sempre.

In conclusione, si preferisca il liquido del RABL (acido picrico e sublimato), il sublimato acquoso e il sublimato acetico; tutti e tre a caldo per qualche minuto, poi a freddo per alcune ore. Quindi si passi *sempre* direttamente nell'alcool forte 90 % per 24 ore, poi nell'alcool jodo-jodurato.

Ma non basta avere una buona fissazione, per ottenere delle buone sezioni; non si deve dimenticare che è necessario superare ancora due difficoltà che dipendono dalla presenza del guscio e del vitello. Il guscio si può sempre forare, per far penetrare le soluzioni coloranti e gli alcool, qualche volta si può anche togliere. Ma, quando questo non è possibile, bisognerà, nel fare le sezioni, invece di un

microtomo rapido e del coltello trasversale, servirsi di quello a slitta, col coltello molto obliquo, e sottomettersi anche alla noia di incelloidinare la superficie delle sezioni (§ 128). Meglio ancora fare il rivestimento misto (§§ 119 e 128). Così si potranno ottenere delle sezioni nelle quali il contorno del guscio sarà mantenuto al suo posto e non verrà a sovrapporsi ed a ripiegarsi sulla superficie di sezione.

Quanto al vitello, bisogna evitare ch'esso diventi troppo friabile; se questo succede, è impossibile fare delle sezioni sottili, ed esse si ridurranno in polvere. Per evitare questo danno, le uova saranno tenute nell'alcool a 95 % per pochi minuti, 10-15, poi nell'alcool assoluto per soli 5 minuti; quindi nell'alcool assoluto e cloroformio, poi nel cloroformio, e qui si lasceranno a lungo con dei pezzetti di paraffina alla temperatura dell'ambiente, od anche nella stufa a 30° C. Ma nella paraffina pura a 50°-55° saranno lasciati per pochissimi minuti, 5-7 al più. Anche per il vitello gioverà fare il rivestimento misto.

Inutile aggiungere che molte difficoltà saranno evitate quando si sappia scegliere il materiale da studio più adatto.

### EMBRIOLOGIA DEI MOLLUSCHI.

**281. Gasteropodi.** — Anche qui troviamo parecchi che danno la preferenza all'acido picro-solforico, al picro-nitrico e al liquido del PERÉNY; altri invece alle soluzioni di sublimato od anche alle miscele osmiche. Fra i più recenti, MEISENHEIMER <sup>1)</sup>, per la *Limax*, ha buoni risultati tanto dall'acido picro-solforico (poi alcool a 70 %) che dal sublimato concentrato (poi alcool iodato); quindi alcool, cloroformio e paraffina.

CONKLIN <sup>2)</sup>, per le diverse specie di *Crepidula*, si serve di molti fissativi, ma dà la preferenza al liquido del KLEINENBERG, lasciandovi le uova da 15 a 30 minuti e trasportandole successivamente nell'alcool a 70 %, dove erano tenute fino a tanto che tutto il colore giallo fosse scomparso, poi erano conservate nell'alcool a 95 %.

Per esaminare le uova *in toto*, le uova, tolte dall'alcool a 95 %, erano messe nell'acqua, quindi colorate con una soluzione di ematossilina DELAFIELD allungata con 6 volumi d'acqua e leggerissimamente acidulata con una traccia di HCl, oppure con qualche goccia di acido picrico. Poi disidratate con olio di legno di cedro o con

<sup>1)</sup> In *Zeit. wiss. Zool.*, 62. 1896, p. 415.

<sup>2)</sup> In *Journ. Morph. Boston*, 13. 1897, p. 7.



xilolo e chiuse nel balsamo, con la precauzione di sostenere il vetrino per impedire lo schiacciamento. Con una o due gocce di xilolo si può rammollire il balsamo, e con leggeri e lenti movimenti del vetrino far girare l'uovo o l'embrione in modo da poterlo osservare in qualunque posizione.

Con questo metodo si hanno delle bellissime preparazioni che servono non soltanto per lo studio della superficie, ma anche della struttura interna. I preparati hanno poi il vantaggio di essere permanenti. Anche per blastodermi di pollo e di passero, per uova ed embrioni di altri molluschi, di anellidi e di echinodermi il metodo dà ottimi risultati.

Per materiale da sezionare si usava lo stesso fissativo od anche l'alcool assoluto o le solite miscele osmiche del FLEMMING e dell'HERMANN. La colorazione sulle sezioni con l'ematossilina DELA-FIELD e poi eritrosina, oppure col liquido del BIONDI o con l'ematossilina ferrica.

**282. Lamellibranchi.** — Vale quel che s'è detto per i gasteropodi. Per conto mio aggiungerò che buoni risultati si hanno dal sublimato alcoolico nitrico acetico (per esempio, la formula che ho data al § 24) ed anche dalle miscele osmiche del FLEMMING e dell'HERMANN. Nel primo caso colorazione *in toto* con l'emallume, poi si lava a lungo con acqua alluminata e acqua distillata. Così si ha un colore puramente nucleare, e sulle sezioni si può fare una buona colorazione del vitello delle uova e del plasma dei tessuti embrionali, tenendole per 5-10 minuti nella fucsina acida al 0.5 ‰. Con le soluzioni osmiche si presta molto il metodo di HEIDENHAIN all'ematossilina ferrica, che del resto dà i migliori risultati col sublimato.

Il maggior numero dei lavori di embriologia sui lamellibranchi (lasciando da parte quelli vecchi) è fatto sulle *Najadi*. Infatti l'*Anodonta* e l'*Unio* sono abbondanti e comuni in moltissimi corsi di acqua dolce e si possono avere con facilità, perchè stanno poco affondate nella sabbia o nella melma. Anche la *Cyclas cornea* è stata oggetto di parecchie ricerche.

Il LILLIE (1895) fissava le uova di *Unio* col liquido del PERÉNY (vedi quanto ho detto ripetutamente di questo fissativo) per un quarto d'ora; gli embrioni più avanzati col sublimato. Per l'esame *in toto* delle larve, l'acido osmico 0.1 ‰ e poi glicerina. I *Glochidium*, prima anestizzati col cloralio idrato, erano fissati e imparaffinati nella paraffina dura (58° C.) e tagliati col guscio. STAUFFACHER (1893) fissava gli embrioni di *Cyclas* nel sublimato, colorava con emallume e imparaffinava.

**283. Cefalopodi.** — VIALLETON (1887) trasporta le uova, tolte dall'ovidotto o dalla tasca peritoneale, nel liquido del KLEINENBERG, al quale si aggiunge altrettanto bicromato potassico al 2.5 ‰; così il

guscio s'indurisce, e può essere tagliato trasversalmente, secondo l'equatore, con delle forbici sottili, dopo solo due minuti di permanenza nel liquido. Allora si prende l'uovo e lo si mette a indurire nel liquido del KLEINENBERG, senza bicromato, per un'ora o una e mezza; dopo questo tempo si potrà facilmente staccare, con una spatola metallica, il blastoderma dal sottostante vitello e distenderla su di una lastra di vetro, passandola nell'alcool a 70 %, poi a 90 %, ecc. Se le uova sono già deposte, si passano direttamente nel liquido del KLEINENBERG.

JATTA consiglia, come materiale da studio, le uova di *Sepia* e quelle di *Loligo* (quelle degli octopodi sono molto più rare), e di fissarle per mezz'ora o un'ora nel liquido dell'HERMANN.

### EMBRIOLOGIA DEI TUNICATI.

**284. Salpe.** — TODARO, che da molti anni si occupa dell'embriologia delle *Salpe*, ha sempre dato la preferenza al liquido del KLEINENBERG e all'acido cromo-acetico (formula del LO BIANCO: acido cromatico 1 % parti 100, acido acetico glaciale 2,5). KOROTNEFF<sup>1</sup>) usa questa seconda soluzione, e poi colora con Magenta (fucsina basica).

Nei lavori americani (CASTLE, RITTER) è indicato il solito acido picro-solforico o picro-nitrico, o liquido del PERÉNY. DAVIDOFF (1889) fissa le uova di *Distaplia* con sublimato acquoso concentrato 3 e acido acetico glaciale 1, per mezz'ora-un'ora. Lava e passa negli alcool. Buoni risultati ottiene anche dalla soluzione di acido picrico satura 3, acido acetico glaciale 1, per 3-4 ore; quindi alcool 70 %, ecc.

### EMBRIOLOGIA DEI VERTEBRATI.

**285. Fecondazione artificiale.** — Come in molti invertebrati, essa può essere ottenuta anche nei vertebrati a fecondazione esterna: pesci ossei, ciclostomi, anfi anuri. Per i pesci e per i ciclostomi (*Petromyzon Planeri*) la fecondazione artificiale si fa, spremendo con una mano l'addome dell'animale, tenuto stretto con l'altra. I prodotti sessuali si fanno cadere nell'acqua fresca, e dopo mezz'ora, poco più, cominciano i fenomeni della fecondazione. Per il *Petromyzon* bisogna avere molti esemplari, essendo le femmine assai più rare dei maschi. Questi ultimi si distinguono facilmente perchè provvisti di un piccolo pene.

<sup>1</sup> In *Zeit. wiss. Zool.*, 62. 1897, p. 410.

Per l'*Amphioxus*, è nota ormai la singolarità che i prodotti sessuali non vengono emessi dagli animali che in una determinata ora della giornata, e precisamente dopo le 4 e fino alle 6 pom. In questo tempo si terranno in osservazione, e quando si vedranno delle femmine deporre delle uova, queste saranno prese su con una pipetta e trasportate in un recipiente con acqua di mare fresca e pulita. Dai maschi si vedrà uscire (dal poro addominale e non dalla bocca!) una nubecola di sperma; anche di questo se ne raccoglierà con una pipetta per versarlo nei recipienti dove sono le uova.

Per gli anfiabi anuri, si prende un maschio ed una femmina; si apre prima questa e dall'utero si tolgono le uova mature che si mettono nell'acqua fresca e pulita; poi si apre il maschio e con una pipetta si raccoglie lo sperma dal vaso deferente e lo si trasporta dove sono le uova. Questo si può fare anche per qualche *Triton*.

**286. Anfiosso.** — Per l'ora della emissione dei prodotti sessuali, vedi qui sopra. Per la fissazione il SOBOTTA <sup>1)</sup> adopera o il liquido del FLEMMING per 24 ore, oppure la miscela di sublimato e acido picrico. Cattivi risultati ottiene dal sublimato concentrato solo. SAMMASSA <sup>2)</sup> osserva le uova *in toto* nel liquido già ricordato: alcool assoluto, glicerina, acido acetico glaciale a parti eguali. Per la fissazione o il liquido di FLEMMING o quello dell'HERMANN, ma tutti e due allungati con acqua, od anche l'acido picro-acetico del BOVERI (ricordo che con quest'ultima miscela il color giallo se ne va molto difficilmente). Ma il miglior fissativo è il sublimato concentrato acquoso con 5 % di acido acetico glaciale.

Le uova piccole e che devono essere prese in gran numero possono essere riunite, durante le diverse operazioni di colorazione, di disidratazione, ecc., dentro un pezzo di membrana dell'ammio di qualche mammifero.

**287. Ciclostomi.** — Uova e larve (piccole) col liquido del FLEMMING (KUPFFER). Ottimi risultati si hanno dal liquido dell'HERMANN per 48 ore, ed anche dal sublimato alcoolico acido.

**288. Pesci.** — Un buon fissativo per i plagiostomi è il sublimato solo (DOHRN, COGGI, ecc.), oppure il sublimato alcoolico acetico (RAFFAELE). Per gli embrioni giovani di *Squalidi*, e per quelli anche più avanzati di *Batoidei*, si può adoperare anche la miscela del FLEMMING o quella dell'HERMANN per 48 ore.

Per i *teleostei* buone preparazioni a scopo morfologico, ma non per ricerche istologiche, di uova in segmentazione si hanno col metodo AGASSIZ e WHITMAN, adoperato a lungo anche dal RAFFAELE (1888).

<sup>1)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 50. 1897, p. 20.

<sup>2)</sup> In *Arch. Entwickl. Mechanik*, 7. 1898, p. 2.

Nel tubo, dove con l'acqua di mare sono le uova, si versa una piccola quantità di acido osmico  $\frac{1}{4}$  ‰: quando esse cominciano ad imbrunire si trasportano in una miscela a parti eguali di cloruro di platino  $\frac{1}{4}$  ‰ e acido cromico 1 ‰, e vi si lasciano per 12-48 ore; poi si fora il guscio e si trasportano nell'alcool, dopo aver lavato a lungo con l'acqua o (meglio ancora) col metodo MAYER (§ 57). Il vantaggio di questa fissazione, come pure di quelle fatte con liquidi che hanno molto acido picrico, è di lasciar sezionare con facilità il vitello, cosa che non si può fare con i fissativi a base di sublimato.

Come fissativo istologico, e d'uso generale, il RAFFAELE si serve della miscela: sublimato acquoso saturo 100, alcool assoluto 50, acido acetico glaciale 10. Con questa fissazione il blastoderma (con il periblasto) si stacca facilmente dal vitello sottostante, beninteso quando sia tolto il guscio (zona radiata). Anche il FELIX <sup>1)</sup> fissa le uova e larve di salmone e di trota col sublimato acetico (sublimato in soluzione satura acquosa 80 cc., acido acetico glaciale 20 cc.). Per allontanare il vitello mette prima le uova, con embrioni avanzati, nel liquido dello ZENKER per qualche minuto, poi nella soluzione salina fisiologica, e qui con aghi stacca tutto il vitello, quindi mette nel fissativo per 45 minuti, poi nell'alcool, ecc.

**289. Anfibi.** — L'operazione preliminare è quella di liberare le uova dalla gelatina e poi dal guscio, per poter fare penetrare il fissativo. La gelatina può esser tolta con una paziente dissecazione con gli aghi; ma, siccome la cosa non è molto facile, necessariamente molto materiale si perderà; di solito questo è piccolo danno, potendosi avere in grande quantità. Oppure si possono mettere le uova, dopo fissate, nell'acqua di JAVELLE, allungata con 3-4 volumi di acqua e poi scuotere fortemente in modo che le uova si liberino dalla gelatina. Oppure si mettono subito le uova nel fissativo, e, quando la gelatina è consolidata, levarla tagliandola. Si può anche coagulare col calore, riscaldando per 5-10 minuti con acqua quasi bollente (90°-95° C.), tagliare la gelatina e mettere nel fissativo. Il guscio si leva, ma difficilmente, con aghi sottili.

Come liquidi fissativi sono specialmente da raccomandare: la miscela di sublimato e cloruro platinico del RABL (§ 53) ed anche l'altra di acido picrico e sublimato. ROSSI (1895), per la *Salamandrina* e il *Geotriton*, ha trovato che il sublimato solo, o meglio acidulato con acido acetico, e il liquido del MINGAZZINI (§ 21) sono i migliori fissativi, superiori alle miscele cromo-acetiche. MORGAN <sup>2)</sup> fissa le uova di *Rana* per 3-5 ore nell'acido picro-solforico ed imparaffina nella

<sup>1)</sup> In *Anat. Hefte*, 8. 1897, p. 254.

<sup>2)</sup> *Development of the Frog's Egg*, New York. 1897. p. 171.

paraffina dura, tagliando a 24-26° C. Così il vitello non è friabile e si taglia facilmente. CARNOY e LEBRUN <sup>1)</sup>, dopo numerosi tentativi, hanno trovato che la miscela del GILSON (§ 23) è da preferire per la fissazione degli ovai, i quali erano prima incisi in diversi punti per facilitare la penetrazione del liquido. Quelli giovani vi erano lasciati per un quarto d'ora, e gli adulti fino a un'ora. Per non avere il vitello friabile, bisogna fare la disidratazione e l'imparaffinamento con molta rapidità. Levato dal fissativo, lavato per un'ora, quindi messo nell'alcool a 80 %, l'uovo, anche il più grosso (*Salamandra*), è lasciato per non più d'un quarto d'ora nell'alcool a 95 % e per 5 minuti in quello assoluto. Poi nel cloroformio e alcool assoluto a parti eguali; appena sceso al fondo si sostituisce alla miscela il cloroformio puro, dove resta da 3 a 15 minuti. Si aggiungono dei pezzetti di paraffina, tanto da raddoppiare la massa, e si trasporta in un tubo chiuso nella stufa a 35° C. Dopo tre ore si mette, per non più di 5 minuti, nella paraffina pura fusa a 52° C. Per economizzare posto sulle lastre, le uova grosse possono esser tagliate all'equatore, conservando la sola metà animale. Con questi metodi le uova di *Salamandra*, *Pleurodeles*, *Triton*, *Rana*, *Bufo*, *Alytes*, *Siredon* e *Bombinator* si conservano senza alcuna contrazione; il nucleo è sempre in contatto col citoplasma, la membrana nucleare sferica.

**290. Rettili.** — TODARO (1893) fissa le uova di *Seps calcica* col liquido del MINGAZZINI (§ 21) per un quarto d'ora, poi passa nell'alcool iodato, ecc. CORNING <sup>2)</sup> uova ed embrioni di *Lacerta viridis* (preferibile all'*agilis*) col liquido del RABL

(acido picrico + sublimato + 2 vol. d'acqua)

per un quarto d'ora e fino a 4-5 ore, secondo le dimensioni. Poi nell'alcool debole 30 %, al quale si aggiunge, a goccia a goccia, alcool forte. Colorazione *in toto* con cocciniglia alluminica (p. 228) (anche il colore dev'essere messo a poco a poco). Le sezioni della paraffina sono fatte con l'aiuto della goccia di paraffina liquida messa sopra alla superficie di sezione. Questo garantisce l'integrità della sezione, per quanto grande e sottile. WILL (1892) apre le uova di *Platydictylus* nel fissativo, che è la soluzione debole del FLEMMING; BÖHM e OPPEL <sup>3)</sup>, per l'*Anguis* e la *Lacerta*, consigliano il sublimato acetico 5 % per 2-3 ore, poi per altre 24 nell'acido picrico, soluzione satura; si leva il guscio e si trasporta in alcool 70 %, ecc.

Per la friabilità del vitello, vedi quanto è detto a p. 218 e al § 289.

<sup>1)</sup> In *La Cellule*, 12. 1897, p. 213.

<sup>2)</sup> Nel lavoro originale (*Morph. Jahrb.*, 23. 1895) non si fa cenno della tecnica. Le indicazioni date nel testo le devo alla gentilezza dell'autore.

<sup>3)</sup> *Taschenbuch*, 1896, p. 178.

**291. Uccelli.** — Quando la linea primitiva non è ancora distinta, si presenta una prima difficoltà: quella di orientare esattamente la cicatrice che sta alla superficie del tuorlo. Tenendo conto del fatto, osservato anche dagli antichi embriologi, che l'embrione degli uccelli è disposto in modo che quando l'uovo è tenuto trasversalmente davanti all'osservatore con l'estremità più arrotondata a sinistra e quella più appuntita a destra, la parte caudale si trova verso l'osservatore (le eccezioni a questa regola sono molto rare), il DUVAL (1884) ha indicato un metodo assai facile per avere segnata distintamente l'orientazione. Egli fa, con una striscetta rettangolare di carta, larga 5 mm., lunga 50, un piccolo triangolo, piegando semplicemente la striscia.

Quindi apre cautamente l'uovo, tenuto a posto nella posizione sopra detta, rompendo parte del guscio in corrispondenza della regione equatoriale, e leva con una pipetta lo strato superiore d'albume, in modo da liberare la zona dove sta la cicatrice. Allora mette sulla superficie del tuorlo il triangoletto di carta, facendo sì che la base si trovi in alto e la punta in basso; tiene leggermente compressa questa forma di carta, in modo ch'essa appoggi bene sul vitello, e con una pipetta riempie questa specie di scatoletta (il cui fondo è formato dalla superficie del vitello) con soluzione di acido osmico 1 ‰. Bastano pochi minuti perchè si formi un triangolo bruno, che indicherà indelebilmente la posizione della cicatrice; e cioè la base del triangolo corrisponderà alla regione cefalica e la punta alla caudale. Lo stesso risultato si ottiene servendosi di una qualunque miscela osmica; ma, del resto, anche l'alcool assoluto o il sublimato daranno una traccia bianca, corrispondente alla zona triangolare che è stata coagulata dal reagente.

Ma con questi metodi non si è ancora ottenuta una buona fissazione della cicatrice, e nei periodi precoci dello sviluppo essa non può essere staccata dal vitello, senza grave pericolo di deteriorarsi, se quest'ultimo non è prima stato indurito. Occorre dunque tagliare, senza ledere il vitello, le due calaze, asportare tutto l'albume e, servendosi del guscio stesso dell'uovo come di recipiente, riempirlo del liquido fissatore e induritore. O si può anche levare con precauzione, mediante una larga spatola, tutto intero il tuorlo, deporlo in un grande e profondo vetro da orologio, in modo che la cicatrice rimanga alla parte superiore, e quindi versare il fissativo. Perchè questo agisca rapidamente anche nella parte sottostante, si potrà, dopo pochi minuti d'immersione, rompere con precauzione e in punti piuttosto lontani dalla cicatrice la membrana vitellina, così che il vitello fuoriesca e si mescoli col fissativo, che in questo modo si avvicinerà alla parte sottostante alla cicatrice. Poco tempo dopo, questa avrà abbastanza consistenza da poter esser presa con una

spatola e trasportata in un altro vetro da orologio con soluzione fresca. Ma, facendo questa operazione, si dovrà trasportare anche una certa quantità del vitello che sta a contatto intorno e sotto alla cicatrice.

Come liquidi fissativi si preferiscano: il sublimato acetico, il liquido del MANN, quello del RABL I e le soluzioni del FLEMMING e dell'HERMANN.

Lo stesso DUVAL (*l. c.*) consiglia anche il calore, come un buon mezzo per fissare il blastoderma di pollo. Dopo segnato il triangolo con la soluzione osmica allungata, 1 a 300, poneva tutto il tuorlo nella soluzione cromica 0,5 %, portata all'ebollizione a bagno maria, poi lasciava raffreddare, ecc.

**292. Mammiferi.** — Nel maggior numero dei casi non è facile aver degli stadi molto precoci che per un numero limitato di forme, cioè per quelle che si possono sacrificare, perchè le prime fasi dello sviluppo hanno luogo nelle tube. Nei piccoli roditori, pei quali si può determinare con esattezza che è avvenuto il coito (anche se questo è notturno), quando si scorge che si è formato il tappo vaginale, conviene aprire l'addome e fissare la tuba *in toto*. KÖLLIKER usava far uscire le uova spingendo con una cannula il fissativo (soluzione osmica) da un estremo tagliato della tuba e raccogliendo il liquido che usciva dall'altra estremità in tanti vetri da orologio nei quali era facile ritrovare le uova; il TAFANI (1889) fissava le tube del *Mus musculus*, varietà nera, nel sublimato. Più tardi le uova devono essere ricercate nei corni uterini, e facilmente si scorge dove stanno anche dall'esterno, perchè in quel tratto il corno si rigonfia, assumendo una forma ovoide; allora si taglia sotto e sopra trasversalmente, e si pone il pezzo nel fissativo. Quando l'uovo è da qualche giorno nell'utero, aderisce così fortemente alla mucosa uterina che è impossibile staccarlo. Ma, se si tratta di piccoli mammiferi, non sarà difficile fare sezioni trasverse di tutto il corno dell'utero, come si fa della tuba. Con mammiferi più grandi bisogna aprire la tuba o il corno dell'utero, cercare le uova con la lente, prenderle con una pipetta, servendosi della soluzione salina 0,9 % o del liquido peritoneale della madre, e portarle nel liquido fissativo.

Quando l'embrione è già formato, e che esistono gl'invogli fetali, bisogna che questi siano tolti prima di immergerlo nella soluzione fissativa; ma, se anche gli invogli devono essere mantenuti in posto, si ricorrerà al liquido del RABL I, o al sublimato alcoolico-acido (§ 24). Il RABL <sup>1)</sup> dice di aver avuto per tutti i vertebrati, in generale, i migliori risultati dalla miscela di cloruro platinico e di

---

<sup>1)</sup> In *Zeit. Wiss. Mikr.*, 11. 1894, p. 164.

sublimato e poi da quella di acido picrico e sublimato; questo per gli embrioni di vertebrati in generale. In qualche caso speciale (stadi precoci di anatra e di Selaci) ebbe buonissime preparazioni servendosi del cloruro di platino 1 % 1 parte, acido picrico soluzione acquosa satura 2 parti, acqua distillata 7 parti; ma con questo fissativo si hanno risultati incerti. Di solito il periodo di fissazione dev'esser lungo, da 12 ore fino a due giorni, secondo l'età. Il RABL ritiene anche che sia molto importante fare lentamente i passaggi nell'alcool, ed egli poneva gli embrioni, levati dal fissativo, in alcool così debole che, posto sulla lingua, se ne sentisse appena il sapore; e poi, d'ora in ora, poneva in alcool gradatamente più forte, in modo da poter arrivare, in circa 24 ore, a quello a 80 ed anche 90 %. Nell'alcool forte aggiungeva la tintura di jodo per levare l'eccesso di sublimato. Per l'osservazione *in toto* del disco embrionale indica come ottimo il cloruro di platino a  $\frac{1}{3}$  %, ma questa fissazione non si presta per la successiva colorazione.

Tutti gli altri fissativi, compreso il liquido del FLEMMING, hanno dato al RABL risultati molto inferiori a quelli ottenuti con i tre liquidi da lui indicati. Per gli embrioni di pesci ossei nei periodi più avanzati egli notava che sulle sezioni la corda dorsale ed i muscoli si laceravano facilmente, e, dopo aver provato, senza frutto, parecchie sostanze, trovò che, mettendo per un istante gli embrioni nel liquido fissativo molto caldo, l'inconveniente era del tutto scomparso. Per la colorazione, il RABL usava farla *in toto*, e preferiva la cocciniglia alluminica (25 g. di cocciniglia polverizzata e 25 g. di allume sono messi a bollire con 800 d'acqua distillata; quando il liquido è ridotto a 600 cc. si raffredda, si aggiunge qualche cristallo di timolo e si filtra ripetutamente; la soluzione fresca colora meglio di una vecchia) fatta agire da un'ora a un giorno, secondo il volume dell'embrione. Buona anche l'ematosilina DELAFIELD (questa può essere benissimo sostituita dall'emateina I A di APÀTHY o dall'emalume del MAYER).

Il SOBOTTA (1895), nel suo lavoro sulla fecondazione e divisione delle uova del topo, raccoglie molti e importanti dati circa il periodo del calore, l'ovulazione, la copula, che possono essere di molta utilità per chi volesse fare ricerche embriologiche su questo mammifero <sup>1)</sup>.

Per quel che riguarda la tecnica l'autore ha avuto cattivi risultati dall'acido picro-solforico. Buoni invece col sublimato, migliori col sublimato ed acido picrico e con le miscele osmiche (liquido del FLEMMING e dell'HERMANN). In queste ultime i pezzi di ovario e

<sup>1)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 45. 1895, p. 25.



di tuba erano conservati per 24 ore od anche più, lavati in acqua e trasportati nell'alcool 60-70 %; quindi in quello a 90 %, fino a quando dovevano essere imparaffinati. Allora erano disidratati, passati in cloroformio e messi nella paraffina 53°-55° C. Le sezioni erano fatte sempre col microtomo a slitta e col coltello molto obliquo; lo spessore da 5 a 15  $\mu$ , ma abitualmente di 10  $\mu$ , sufficiente anche per lo studio dei dettagli. Farle di 5  $\mu$  era talvolta dannoso per lo studio delle figure cariocinetiche, che venivano tagliate attraverso. Le sezioni erano attaccate al vetrino col mezzo di un sottilissimo strato di albumina glicerinata. Il SOBOTTA evita di attaccarle con acqua distillata, perchè il grasso indurito dall'acido osmico difficilmente aderisce bene (vedi § 138). Infine l'autore sconsiglia di cercare di isolare l'uovo dalla tuba o di farlo staccare con un getto di liquido, e trova sempre preferibile e più sicuro ricorrere alle sezioni del materiale (tuba o utero) fissato e indurito.

**293. Ricerca del materiale.** — Di embrioni umani può capitare di averne dai medici o dalle levatrici. Disgraziatamente, nel maggior numero dei casi, gli embrioni più interessanti, cioè i più precoci, vengono maltrattati e malamente conservati. Ricevendone, la prima cura sarà di metterli in un fissativo energico.

Dai pubblici macelli si potranno avere embrioni di pecora, di capra, di majale; ma qui, se sarà più facile avere del materiale ben conservato, non altrettanto facilmente si potranno avere gli stadi più precoci, perchè quelli che sono ancora nelle tube sfuggiranno facilmente all'occhio, di solito poco esperto, del personale. Bisognerebbe avere la pazienza e il tempo disponibile per potersene occupare da sè. Meno difficile <sup>1)</sup> sarà avere stadi precoci di carnivori domestici (cani, gatti), e il materiale più abbondante e più completo verrà naturalmente fornito dai roditori. A cagione della sua piccolezza e della minor spesa, il topo sarà da preferirsi al coniglio. Si poterono avere anche serie di embrioni da qualche chiroterro e dalla talpa.

**294. Ricapitolazione sui metodi embriologici per i vertebrati.** — Anche qui, come sempre, l'operazione di maggiore importanza è quella della fissazione; quando questa è ben fatta, l'indurimento e la colorazione sono facili. Nelle successive operazioni i due soli punti da tener presenti sono: disidratazione rapida; azione del calore, nell'imparaffinamento, ridotta al più breve tempo possibile. Ho riportato più sopra il metodo indicato dal RABL per non rendere troppo duro il tessuto muscolare, cioè la fissazione a caldo; ma io

---

<sup>1)</sup> Tuttavia si veda: DUVAL, in *Arch. anat. phys.*, 1893, p. 249 e BONNET, in *Anat. Hefte*, 9. 1897, p. 422.

non ho alcuna esperienza personale per poter riconoscere se questo metodo, consigliato del resto da persona competente, abbia l'importanza che l'autore vi attribuisce.

Venendo a dire della fissazione, dopo tutto quello che ho ricordato nel capitolo dedicato ai liquidi fissativi, e quanto ho avuto occasione di rammentare successivamente, posso limitarmi a brevissime osservazioni. Qui, negli embrioni, sono tanto più da temere quei liquidi che tendono a gonfiare alcuni tessuti od anche a dissolverli, e quindi bisogna evitare tutte quelle sostanze che possono far credere all'esistenza di vacuoli o di cavità, risultato artificiale della fissazione. Certamente bisogna essere cauti anche nell'uso dei liquidi troppo energici e che producono delle contrazioni così notevoli da far perdere la traccia di cavità realmente esistenti. Quindi saranno da consigliare le soluzioni di sublimato da 4-6 ‰, con piccole quantità di acido acetico od anche di alcool, e i fissativi del RABL a base di sublimato, cioè il sublimato e l'acido picrico, il sublimato e il cloruro platinico. Si metta in ultima linea l'acido picrosolforico, il liquido del KLEINENBERG, quello del PERÉNY e l'acido picronitrico. Si tenga conto in molti casi dell'utilità dell'acido osmico, o, meglio ancora, delle soluzioni osmiche del FLEMMING e dell'HERMANN.

**295. Corpi lutei dei mammiferi.** — Il SOBOTTA <sup>1)</sup>, per il topo e il coniglio, usa fissare l'ovario con la soluzione del FLEMMING, ma diminuendo la quantità di acido osmico, e con la miscela di acido picrico, sublimato ed acido acetico glaciale 2 ‰. Tanto l'uno che l'altro per 24 ore. Le sezioni ottenute dalla fissazione osmica si attaccano male con l'acqua distillata, e per queste si deve adoperare la glicerina-albumina (vedi anche § 138). Colorazione con ematossilina e quindi eosina; quest'ultima, colorando intensamente i globuli di sangue, mette bene in evidenza anche le più piccole emorragie.

## CAPITOLO XXIII.

### Metodi istologici. Tessuti ed organi.

#### GLI EPITELI.

**296. La pelle.** — Buoni risultati si hanno dal preparare piccoli pezzi col metodo dell'oro, secondo LÖWIT o RANVIER, e poi facendo le sezioni. Anche dalle fissazioni col sublimato e colorazione doppia con emallume e fucsina, oppure col cloruro d'oro, secondo i

<sup>1)</sup> In *Anat. Hefte*, 8. 1897, p. 475.

metodi dell'APÀTHY (capitolo XXIV), si avranno dei preparati dimostrativi. Per la preparazione delle cellule epidermiche bisogna ricorrere alla macerazione (vedi § 161

Anche per i peli e le unghie bisogna ricorrere alla macerazione con la potassa caustica 40 %.

I metodi dell'impregnazione con l'oro furono usati largamente per lo studio dei corpuscoli tattili e delle fibre nervose nella pelle. Più di recente si è adoperata molto anche l'impregnazione nera, metodo rapido, e l'impregnazione ripetuta (vedi capitolo XXIV).

REINKE (1894), per lo studio dei ponti intercellulari nello strato germigeno dell'epidermide, fissa in alcool un pezzetto di pelle del dito umano, fa sezioni sottili in paraffina e le lascia per diversi giorni in una soluzione concentrata alcoolica di saffranina, allungata con altrettanta acqua, lava bene con acqua, poi scolora in una soluzione alcoolica di acido picrico (questa deve avere il colore del vino bianco chiaro) per 1-3 ore; porta nell'alcool assoluto, poi nell'olio di bergamotto (evitare quello di garofano) e chiude.

Per lo studio dell'unghia su sezioni trasversali, bisogna rammollire l'estremità del dito mignolo di un bambino di 5-8 anni nella soluzione di potassa a 40 % per 1-2 ore, poi fare la fissazione col liquido dello ZENKER per 3-4 giorni, quindi passare nell'alcool e decalcificare con l'alcool acidulato con acido nitrico; quindi in alcool puro a 80 %, colorare con paracaminio, ecc. Si può anche colorare dopo sulle sezioni, ricorrendo all'emallume e al carmallume o ad una doppia colorazione.

Se si vuole limitare la ricerca alle sole fibre elastiche della pelle, come pure di un altro organo qualunque, si procederà come segue:

**297 Fibre elastiche.** — Metodo UNNA-TAENZER, un po' modificato dal dott. LIVINI<sup>1)</sup> e che dà preparati molto belli e duraturi.

Si preparino queste due soluzioni: orceina 1, HCl 1, alcool assoluto 100; alcool 95 % 20, H<sup>2</sup>O 5, HCl 0,1. Si mescolano in un vetro da orologio 30 gocce della prima soluzione con 5-10 cc. della seconda. Qui si immergono le sezioni fissate o con alcool assoluto o con sublimato, e vi si lasciano per 12 ore, coprendo bene il recipiente; si lavano accuratamente con alcool 90 %, cambiandolo fin che non rimane più colorato (si possono lasciare le sezioni nell'alcool anche per diversi giorni). Si disidrata, si rischiara con olio di origano e si chiude in balsamo. Volendo, si può fare una colorazione secondaria con l'emallume o col carmallume.

---

<sup>1)</sup> In *Monit. Zool. ital.*, 7. 1896. p. 45.

Ho visto preparati di due anni che mostravano distintamente anche le più sottili fibre elastiche, che spiccavano per il loro colore intenso sul fondo molto chiaro.

**298.** Per lo studio delle terminazioni nervose epidermiche speciali di alcuni animali servono, oltre i metodi con l'oro già ricordati, anche le iniezioni col blu di metilene (capitolo XXIV); talvolta danno dei risultati bellissimi. Quanto s'è detto per l'epidermide vale anche per lo studio delle terminazioni nervose della cornea. Per la preparazione della lente vedi occhio.

**299. Mucosa dell'apparato digerente.** — Pezzi di lingua, esofago, stomaco, intestino si fissaranno col sublimato solo, per poi usare la colorazione del BIONDI-HEIDENHAIN o quella all'ematossilina ferrica di HEIDENHAIN; col sublimato acetico e col sublimato alcoolico acido per la doppia colorazione emallume e fucsina. Con piccoli pezzi si avranno buoni risultati dalla fissazione nella miscela dell'HERMANN per 48 ore e quindi colorazione con la saffranina o col metodo GALEOTTI (§ 93).

**300.** Per le glandole secernenti (glandole salivari, peptiche, pancreas), per il fegato e la milza, valgono gli stessi metodi; od anche la miscela del MANN, dello ZENKER, e il sublimato e cloruro platinico del RABL. Ma specialmente qui è da raccomandare la fissazione in HERMANN per 48 ore, e quindi la colorazione secondo il metodo GALEOTTI.

**301. Ricerca della mucina.** — Anche per questa è da consigliare il metodo del GALEOTTI; si può anche adoperare il sale di ferro, come consigliano MAYER e LIST <sup>1)</sup>. Sezioni di materiale fissato col sublimato o con l'alcool assoluto sono bagnate con una soluzione di acetato di ferro allungata e tenuta un giorno in una camera umida, oppure con cloruro di ferro acidulato con acido cloridrico per mezz'ora. Poi si asciuga od anche si lava rapidamente con acqua distillata e si tratta con una soluzione all'1 1/2 ‰ di ferrocianuro potassico (giallo).

Per questo stesso scopo di ricercare la mucina il MAYER proponeva (*l. c.*) due sostanze coloranti speciali, il *mucicarmin* e la *mucemateina*. Ecco come si prepara il primo: carminio 1 g., cloruro d'alluminio 0,5 g., H<sup>2</sup>O 2 g. Si riscalda per due minuti e poi si aggiungono 100 cc. di alcool a 50 ‰, si lascia riposare per 24 ore e poi si filtra. Questa è la soluzione madre che si allunga, *al momento di servirsene*, con 9 parti di acqua su una di soluzione, e si adopera per la colorazione delle sezioni o delle sottili membrane. Si colora il solo muco, non il nucleo, per il quale si può adoperare una se-

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. St. Neapel*, 12. 1896, p. 307 e 490.

conda colorazione con emallume. La *mucemateina* si prepara tritu-  
rando in un mortaino 0,2 g. di emateina con qualche goccia di gli-  
cerina; si aggiunge quindi cloruro di alluminio 0,1 g., glicerina 40 cc.,  
acqua distillata 60 cc. Volendo una soluzione alcoolica, si fa a meno  
della glicerina e dell'acqua, che si sostituiscono con 100 cc. di alcool  
a 70 %, acidulato con 1-2 gocce di acido nitrico. Servono tutte e  
due per colorare le sezioni. I nuclei si tingono *prima* con paracar-  
minio. La fissazione dei pezzi deve essere fatta evitando possibil-  
mente le soluzioni acquose, quindi di preferenza con alcool as-  
soluto.

Per lo stesso scopo HOYER (1890) fissava in sublimato 5 % per  
2-8 ore, faceva le sezioni in paraffina e colorava per 5-15 minuti in  
una soluzione di tionina (2 gocce di soluzione acquosa satura in  
5 cc. di acqua); la mucina si tinge in rosso, o, a meglio dire, rosa-  
vinoso, mentre il resto del tessuto è più o meno azzurro.

KULTSCHITZKY <sup>1)</sup> fissa con la sua miscela (§ 47) e colora le sezioni  
o in safranina sciolta in 2 % di acido acetico o in congo, per due o  
tre giorni, poi lava con alcool e chiude.

Per la letteratura sull'argomento, vedi HOYER, e per l'effetto delle  
diverse sostanze coloranti sulla mucina il MAYER già citato.

**302. Glandule peptiche.** — Per la distinzione fra le due specie  
di cellule delle glandole peptiche (che del resto si differenziano fa-  
cilmente con molte doppie colorazioni), il KOLSTER (1895) sopracco-  
lora le sezioni con l'ematossilina alcoolica DELAFIELD, poi tratta  
con alcool acido (1 % di HCl), neutralizza con alcool alcalino (1 % di  
H<sup>3</sup>N), così che si abbia un colore leggermente blu, e quindi colora,  
dopo lavato con acqua, per 1-5 minuti con una soluzione debole di  
fucsina acida. Così si tingono le cellule principali in blu, quelle di  
ricoprimento in rosso. Il materiale deve essere fissato col sublimato o  
con l'alcool, *non* con miscele osmiche.

**303. Fegato.** — Oltre ai metodi già indicati, per lo studio dei ca-  
pillari biliari è utile il metodo rapido del GOLGI. BRAUS (1896)  
adopera anche la fissazione con formalina 1 parte e 3 parti di solu-  
zione di sublimato (7 1/2 %) nell'acqua salata. Colora col Bordeaux R  
e quindi ematossilina ferrica (vedi § 75), oppure con la miscela del  
BIONDI (vedi anche § 300).

**304. Rene.** — Valgono i metodi già indicati per la mucosa dell'ap-  
parato digerente.

Un buon fissativo è anche il liquido dello ZENKER, ma per essere  
sicuri della penetrazione si dovrà iniettarlo ripetutamente per l'ar-  
teria renale.

<sup>1)</sup> *Arch. Mikr. Anat.*, 49. 1896, p. 7.

**305. Milza.** — Per lo studio dello sviluppo di quest'organo in diversi vertebrati WOIT <sup>1)</sup> s'è servito come fissativo del liquido del RABL (cloruro di platino, sublimato, acqua) e della cocciniglia alluminosa (p. 228) per colorante. Questo metodo gli ha dato buoni risultati tanto negli anfibi che negli uccelli. Vedi anche § 241.

### I TESSUTI CONNETTIVI.

**306. Fibre elastiche.** — Vedi § 297.

**307. Ossa. Tessuto osseo.** — Negli embrioni le ossa si rendono trasparenti con la potassa caustica e glicerina.

Per isolare lo scheletro dalle parti molli, tanto per lo scheletro cartilagineo che per quello osseo dei pesci, THILO <sup>2)</sup> mette l'animale nell'acqua, poi per una o più settimane nell'acido solforico 1 parte, acqua 10; dopo isolato lo scheletro, lo passa nella soluzione sodica 4 ‰. Se non si vuole che venga intaccato il carbonato di calce delle ossa, si sostituisca l'alcool (70-80 ‰) all'acqua nella soluzione con acido solforico.

**308. Sezioni a secco di tessuto osseo.** — Preparati molto dimostrativi si hanno col vecchio metodo del RANVIER. I pezzi di osso devono essere bene sgrassati, e questa operazione è lunga a farsi sulle ossa fresche, perchè occorrono parecchi mesi di macerazione nell'acqua, e bisogna disporre di acqua corrente, altrimenti nell'interno dell'osso si formano delle muffe nere, che ben difficilmente si riesce a togliere.

Un modo semplice di girare la difficoltà consiste nel raccogliere qualche pezzo d'osso, che si trova facilmente all'aperto in campagna e che s'è già sgrassato naturalmente stando esposto per lungo tempo alle vicende atmosferiche, cioè all'azione dell'acqua e del calore solare.

Volendolo preparare dal fresco, si prenderà un osso lungo, non molto grosso, si taglieranno le due epifisi e s'infilerà un'estremità dentro un pezzo di tubo di cauciù, e si sottoporrà per qualche giorno ad una corrente d'acqua, per levare bene il midollo. Quindi si metterà tutto in un recipiente d'acqua, e dopo alcuni giorni si pulirà accuratamente all'esterno da tutte le sostanze molli che vi aderiscono, servendosi di una spazzola robusta. Poi si rimetterà nell'acqua e si esporrà al sole alternativamente per un paio di mesi; l'operazione non riesce bene che nell'estate.

<sup>1)</sup> *Anat. Hefte*, 9. 1897. p. 136.

<sup>2)</sup> *Anat. Anzeiger*, 12. 1896. p. 244.

Con una sega sottile, come quelle fatte con una molla da orologio, si taglia, nella direzione desiderata, un pezzetto di osso, che poi si consuma su di una ruota comune da arrotino finchè si può; quando la sua sottigliezza è tale da non poterlo più tenere fra due dita, si sfrega fra due pezzi di pomice bagnati con acqua e poi su d'una pietra da rasoio non unta (se lo è, si lavi prima con acqua e sapone), e che si bagna con acqua distillata; tenendo il pezzetto di osso compresso contro la pietra, col polpastrello del dito indice, si riuscirà, con un movimento di su e giù, ad assottigliare ancora, e in pari tempo a lisciare sulle due superficie la fettina, che raggiungerà presto la finezza e la trasparenza di una membrana. Allora si lava accuratamente nell'acqua distillata e si lascia seccare bene. Quando sia seccata, la si depone rapidamente su di una goccia di balsamo del Canada denso (non allungato con olio o xilolo o cloroformio), che si è fuso al momento sulla lastra, riscaldandola un poco alla fiamma. Appena deposta la sezione, si copre rapidamente col vetrino, e si favorisce il raffreddamento agitando la lastra all'aria. Se la deposizione della sezione e la chiusura è stata fatta con rapidità, si avranno dei preparati molto dimostrativi, perchè nelle sezioni dei canaliculi ossei, delle così dette cellule ossee e delle loro diramazioni sarà rimasta dell'aria, e questa, in mezzo al balsamo spicca al microscopio, dando un disegno nero che è una perfetta negativa, un modello della struttura dell'osso.

Quando non si fosse sicuri del perfetto sgrassamento dell'osso, si potrà trattare la sezione, prima di metterla nel balsamo, con l'etere solforico.

**309. Sezioni di osso fresco** — Si prendono piccoli pezzi di osso giovane e si fissano a lungo con la soluzione forte del FLEMMING, quindi si decalcifica (§ 153) con l'alcool e acido nitrico. Meglio seguire il metodo ROUSSEAU (§ 154) e prima incelloidinare, poi decalcificare ed anche scolorare col metodo MAYER (§ 157). Quindi si fanno le sezioni, che si potranno colorare come meglio si crede.

Altri fissano il tessuto e decalcificano contemporaneamente servendosi dell'acido cromatico o dell'acido picrico, oppure dell'acido picronitrico (non il picrosolforico, perchè si formano cristalli insolubili di gesso); ma credo che questi metodi siano molto più dannosi ai tessuti di quello che ho più sopra raccomandato.

**310. Denti.** — Valgono le stesse indicazioni date per le ossa.

**311. Cartilagine.** — Se dura, si prepari come le ossa, cioè si fissi a lungo in FLEMMING e si decalcifichi. Se elastica si fissi col liquido del VOM RATH (acido picrosmico e cloruro di platino), oppure con le miscele del FLEMMING o dell'HERMANN. Si adopere il sublimato solamente quando la cartilagine è molto molle, altrimenti si taglia difficilmente in sezioni sottili (inferiori ai 10  $\mu$ ), perchè il sublimato indurisce il tessuto connettivo fibroso e la cartilagine.

**312. Cartilagine jalina.** — Essa può essere studiata a fresco, facendo delle sezioni col rasoio, a mano libera, della cartilagine del capo articolare del femore di un anfibio e mettendola sulla lastra col liquido tolto dall'occhio dello stesso animale. Si può anche adoperare uno dei liquidi indifferenti o delle miscele consigliate al capitolo XII, e colorare con verde di metile. FUSARI (1896) poneva le sezioni, tagliate col rasoio o col microtomo a congelazione, in una soluzione 1 % di nitrato d'argento per 24 ore, lavava con acqua, passava negli alcool, chiudeva in balsamo ed esponeva alla luce.

**313. Tessuto connettivo e cellule plasmatiche.** — Buoni preparati si hanno dalla fissazione in sublimato e colorazione col liquido del BIONDI o con altre doppie colorazioni. Anche il metodo dell'ematossiline ferrica HEIDENHAIN può dare risultati interessanti. LÖWENTHAL (1893), MERKEL (1895), SPULER<sup>1)</sup> adoperano per fissativo il liquido del GOLGI (bieromato potassico al 4 % parti 4, acido osmico 1 % parti 1), nel quale si pongono piccoli pezzi di tessuto; dopo 24 ore si lava bene, poi si passa in alcool e qui si lascia per 36-48 ore; quindi si colora col carminio alluminico, o con l'emateina IA, od anche con l'ematossiline ferrica. FLEMMING<sup>2)</sup>, per studiare lo sviluppo del tessuto fibrillare collogeno, adopera il suo fissativo, tanto negli anfi, che nei mammiferi, lasciandovi il tessuto per alcune settimane, ed anche per qualche mese. Colora le sezioni col suo metodo della saffranina-genziana-orange (§ 101).

**314. Tessuto collogeno. Cellule plasmatiche. Mastzellen.** — Ecco il metodo di UNNA (1894):

*Metodo con l'orceina:* Fissazione con alcool, colorazione con una soluzione concentrata di *polychromen Methylenblau* di GRÜBLER (che è un blu di metilene impuro) per 5 minuti, si lava con acqua e si trasporta in una soluzione neutra in alcool assoluto a 1 % di orceina per 15 minuti, si lava con alcool assoluto, si rischiarà con olio di bergamotto e si chiude in balsamo. La sostanza collogena ha i nuclei blu, il citoplasma rosso-scuro; i granuli delle *Mastzellen* sono rosso-carminio; le cellule plasmatiche blu.

**315. Cellule plasmatiche e Mastzellen.** — BERGONZINI (1891) colora le sezioni di materiale fissato con alcool o con sublimato per 3-4 minuti con una miscela di fucsina acida 1 vol.; verde di metile 2 vol.; orange oro 2 vol.; tutte e tre le soluzioni acquose al 0,2 %. Lava per 2 minuti in acqua e altrettanti nell'alcool assoluto, rischiarà con olio di bergamotto e chiude in balsamo.

**316. Tessuto adiposo.** — Il grasso è rivelato dall'acido osmico,

<sup>1)</sup> *Anat. Hefte*, 7. 1896, p. 130.

<sup>2)</sup> In *Arch. Anat. Phys. Anat. Abth.*, 1897, p. 174.



che lo colora in nero, per quanto sia vera l'espressione di HEIDENHAIN seniore, che, come non è oro tutto quel che luce, così non è grasso tutto quel che l'acido osmico annerisce. Il FLEMMING rammenta che il grasso annerito dall'acido osmico perde a poco a poco il colore quando le sezioni sono state trattate con le sostanze rischiaranti (trementina, xilolo, olio di garofano, olio di origano, etere, cloroformio, creosoto, ecc.). La trementina ed il creosoto scolorano molto rapidamente; può quindi essere utile servirsi di questo metodo per lo studio della cellula del grasso.

Il grasso si colora molto bene nei tessuti col metodo del DADDI<sup>1</sup>. Si prepara una soluzione in alcool a 90 % di SUDAN III, un colore rosso acido di anilina, insolubile nell'acqua, e si colorano le sezioni del pezzo, fissato col liquido del MÜLLER, per 5-10 minuti, si lava per altrettanto tempo nell'alcool 90 %, si asciuga con carta bibula e si conserva in glicerina. Il solo grasso rimane colorato, in rosso o in orange; anche le più piccole goccioline sono visibili: la mielina si colora in giallo opaco. Le sezioni si fanno col microtomo a congelazione o a mano; bisogna evitare il rivestimento, perchè le sostanze già ricordate che si adoperano nel rivestimento scioglierebbero il grasso. Siccome tutto il tessuto rimanente è scolorato, si può fare una doppia colorazione con l'emallume. Prolungando il trattamento con l'alcool, la mielina si scolora, ma il grasso anche dopo un'ora conserva tutto il suo colore.

**317. Tessuto adenoide, connettivo delle mucose, ecc.** — Fissazione con l'alcool od anche col sublimato saturo. HOEHL<sup>2</sup>), sulle sezioni dalla paraffina, attaccate con l'acqua distillata, grosse da 6 a 10  $\mu$ , fa il trattamento con la soda a 3 % e poi con la pancreatina, quindi colora. In questo modo rimane solo il tessuto connettivo. Per mettere in evidenza le fibre elastiche, vedi sopra § 297.

## IL TESSUTO MUSCOLARE E LE TERMINAZIONI NERVOSE MOTRICI.

**318. Cellule muscolari lisce.** — Per studiare le cellule isolate bisogna sciogliere la sostanza cementante intercellulare con una leggera macerazione. Si può adoprare l'acido cromico e l'acido osmico a 1<sup>00</sup>/<sub>00</sub>; meglio la potassa caustica 36 %. SCHULTZE<sup>3</sup>) pone i tessuti dei vertebrati per 24 ore nell'acido nitrico a 10 %, isola i piccoli pezzi che

<sup>1</sup>) In *Arch. Ital. Biol.*, 26. 1895. p. 143.

<sup>2</sup>) In *Arch. Anat. Phys. ; Anat. Abth.*, 1897. p. 135.

<sup>3</sup>) *Idem ; Phys. Abth.*, 1895-1896. p. 521.

trasporta, dopo lavati con acqua, in una miscela a parti eguali di 0,05 % acido osmico e 0,2 % acido acetico, e li tiene all'oscuro per una settimana. Con degli aghi completa la dissociazione e chiude in glicerina. Si può colorare con carminio acetico.

Per molti muscoli d'invertebrati è da raccomandare la miscela dall'APÀTHY (§ 161).

**319. Tessuto muscolare liscio.** — Valgono i soliti metodi generali di fissazione e colorazione; si preferisca il sublimato acido, il sublimato e acido osmico, e per i piccoli pezzi il liquido del FLEMMING e quello dell'HERMANN.

Buon materiale si ha nella tunica muscolare dell'intestino degli anfi; per i mammiferi serve specialmente la vescica urinaria.

**320. Differenziamento del tessuto muscolare dal connettivo.** — Buonissimi preparati, tanto con i tessuti dei vertebrati che con quelli degli invertebrati, si ottengono con la triplice colorazione dell'APÀTHY. I pezzi fissati con sublimato sono colorati *in toto* o sulle sezioni con emallume o emateina IA. Le sezioni, attaccate sul vetro, sono tenute per uno o due minuti in questa miscela: picrato d'ammoniaca g. 0.80, Rubin S g. 0.20, alcool assoluto g. 10, H<sup>2</sup>O g. 90. Poi si asciuga con carta bibula satinata, per abbreviare la disidratazione, che scioglierebbe troppo picrato d'ammoniaca. Si passa rapidamente nell'alcool assoluto, nel xilolo e si chiude nel balsamo.

Questa triplice colorazione è molto dimostrativa. I nuclei sono tutti blu-nerastro, i muscoli gialli, il tessuto collogeno rosso. Inoltre la mielina è giallo smorto, i cilindrassi rossi, rossa la cartilagine, giallo carico l'emoglobina, roseo il citoplasma dei leucociti.

Non volendo passare le sezioni nell'alcool assoluto, si possono chiudere i preparati, dopo colorati e asciugati, nella gomma-sciroppo dell'APÀTHY.

**321. Muscoli striati.** — Bellissimi preparati per lo studio dell'istogenesi della fibra striata si hanno fissando in stadi precoci le larve di *Salamandrina perspicillata* e di altri anfi col liquido dell'HERMANN e colorando col metodo GALEOTTI (§ 93) o con altre aniline. Le sezioni devono essere sottili (da 3 a 5  $\mu$ ).

Per esaminare a fresco le fibre striate può bastare la dissociazione, oppure anche una leggera macerazione, e quindi servirsi delle indicazioni già date nel capitolo XIV. Anche la dissociazione di materiale fissato, colorato e disidratato può dare dei buoni risultati. In questo caso la dissociazione si fa bene servendosi di una goccia di essenza di garofano. Notissimi, per lo studio della fibrilla elementare striata, sono i muscoli motori dell'ala di alcuni grossi coleotteri acquatici (*Ditiscus*, *Hydrophilus*).

**322. Placche motrici, innervazione dei muscoli lisci e striati della cornea, ecc.** — Vedi i metodi dell'oro, l'impregnazione nera e la co-

lorazione, così detta vitale, col blu di metilene, nel capitolo seguente. Vedi anche i §§ 105, 106 e seguenti.

Per le terminazioni nervose nei muscoli degli insetti RAMON Y CAJAL (1890) poneva un pezzetto di tessuto per 12-24 nel solito liquido (bicromato potassico ed acido osmico), poi per 24 ore nel nitrato d'argento a 0.75 %, quindi alcool, olio di garofano, trementina e resina, lasciando allo scoperto. BIEDERMANN iniettava una soluzione a 0.5 % di blu di metilene all'*Hydrophilus piceus*, passando con l'ago fra due anelli addominali, e lasciava l'animale vivere nell'acqua per 3-4 ore, apriva quindi il torace e levava i muscoli delle zampe anteriori, che poneva all'aria in una camera umida per 3-4 ore. Quindi esaminava nella soluzione salina. Per la fissazione del blu di metilene vedi nel capitolo seguente il metodo BETHE.

**323. Organi elettrici.** — BALLOWITZ (1893) prepara l'organo elettrico della *Torpedo* col metodo GOLGI, od anche con la dissociazione nell'acqua, dopo fissazione con acido osmico a 1 % per 1-2 giorni e colorazione con violetto di genziana. Il BALLOWITZ, che passa in rivista e discute i metodi dei suoi predecessori, è contrario all'uso del nitrato d'argento e del cloruro d'oro come impregnazione; neanche il liquido del FLEMMING, l'acido nitrico, ecc., darebbero buoni risultati. IWANZOFF (1895) fa un'iniezione interstiziale nell'organo con acido osmico a 0.5-2 % e dopo qualche minuto mette nel liquido del MÜLLER a indurire, quindi lava, colora con ematossilina, e imparaaffina. Per l'organo della coda nella *Raja* fissa nel liquido del FLEMMING e colora con emacalcio ed eosina. BALLOWITZ<sup>1)</sup>, per lo stesso organo, fissa in sublimato concentrato nell'acqua salata o nel liquido del FLEMMING. Anche l'impregnazione nera, secondo GOLGI, gli ha dato buoni risultati.

## CAPITOLO XXIV

### Sistema nervoso centrale e periferico; gli organi dei sensi.

**324. Generalità.** — Per molti anni, e parzialmente anche oggidi, lo studio del sistema nervoso centrale venne fatto adoperando, per fissare ed indurire, il bicromato potassico e il liquido del MÜLLER. E certamente buoni servigi ha reso questo sale dell'acido cromatico, che ha permesso di ottenere discretamente preparato un materiale

---

<sup>1)</sup> *Anat. Hefte*, 7. 1897, p. 285.

difficile e voluminoso. Interi encefali umani poterono essere studiati in tal maniera, ed anche oggidì la fissazione e l'indurimento col bicromato sono il punto di partenza di metodi speciali ed importantissimi per la conoscenza della fine topografia del sistema nervoso (WEIGERT, GOLGI, ecc).

Ma come fissativo delicato esso è stato del tutto abbandonato, perchè altera la struttura ed i rapporti degli elementi e delle loro parti. Anche per l'indurimento degli interi encefali al bicromato vengono preferite altre soluzioni, come si dirà più avanti.

**325. Fissazione e indurimento di interi encefali di mammiferi. —**

Col bicromato potassico e col liquido del MÜLLER. Si fa prima una lunga iniezione col liquido al 2 ‰, mettendo la cannula nella carotide interna<sup>1)</sup>, poi s'immerge l'encefalo nella soluzione al 2 ‰ e si sostituisce, dopo 24 ore, con una soluzione fresca. Dopo altre 48 ore si leva con diligenza la pia madre (è dannoso aspettare di più, perchè i vasi induriti tagliano facilmente la sostanza nervosa; ad ogni modo si faccia questa operazione con pazienza ed accuratezza), e si mette il pezzo nella soluzione rinnovata e più forte, 3 ‰. Se questa è abbondante (5-10 volte il volume dell'organo), non sarà necessario cambiarla, altrimenti si rinnoverà una o due volte. Nell'estate bastano 8-10 giorni, e nell'inverno ne occorrono 20-30. Ed in questo caso il tempo sarà abbreviato con vantaggio tenendo il vaso chiuso dentro un termostato a 25°-30° C. È importante che nei primi giorni l'encefalo non poggi sul fondo del vaso, perchè, essendo molto molle, si deformerebbe; oltre a ciò, il liquido feccioso del fondo non darebbe un buon indurimento. Per ovviare questi inconvenienti, si metta sotto all'encefalo un grosso strato di bambagia.

Più rapido è l'indurimento con la miscela dell'ORTH: liquido del MÜLLER parti 10, formalina 1.

Quando l'indurimento è completo, si lava nell'acqua corrente per alcuni giorni di seguito; poi si passa nell'alcool a 70 ‰, che dovrà essere cambiato 2-3 volte.

Questo materiale potrà essere tagliato con appositi larghi microtomi (GUDDEN) in grosse fette, che, colorate, rischiarate e attaccate ad uno strato di collodio, danno delle buone preparazioni per lo studio della grossa topografia cerebrale.

**326.** Col metodo GIACOMINI si conservano bene interi encefali a secco. Il pezzo va immerso in una soluzione satura acquosa e abbondante di cloruro di zinco (meglio con lo stesso liquido fare prima una iniezione per la carotide interna); dopo qualche tempo l'encefalo che prima galleggiava, va a fondo. Passate 48 ore, la pia viene tolta,

<sup>1)</sup> Nei piccoli mammiferi nell'aorta.

e dopo altre 48 ore la fissazione è completa. Levato dal cloruro di zinco e lasciato sgocciolare, l'encefalo si mette nell'alcool a 70-80 %, dove può restare per un tempo illimitato. Quando si vuol fare la preparazione a secco, si lascia il pezzo nell'alcool per 8-10 giorni, poi si toglie, si asciuga e si passa nella glicerina, alla quale sia aggiunto 1-2 % di acido fenico. Dapprima lo si vedrà galleggiare, ma a poco a poco scenderà al fondo, e dopo 5-6 giorni la glicerina avrà sostituito l'alcool. Tolto dal liquido, lo si pone su di un piano inclinato ad asciugare; appena la superficie sta per disseccare (48 ore bastano, quando la stanza sia arieggiata ed asciutta) si riveste con una vernice di glu marina.

Se si vogliono fare delle sezioni per lo studio topografico, si passa l'encefalo dall'alcool a 80 % al microtomo. L'inconveniente del metodo è la forte spesa alla quale si va incontro per l'alcool e per la glicerina.

**327. Con la formalina.** — È questo il metodo più usato, perchè semplicissimo e *poco costoso*; ma non si dimentichi che ha un inconveniente: la formalina scioglie non solo il pigmento del sangue, ma anche quello delle cellule nervose, di maniera che, dopo alcuni giorni d'immersione, non si distingue più la sostanza grigia da quella bianca.

Si fa una soluzione al 4 % della solita formalina del commercio; dopo 48 ore si toglie la pia madre (operazione poco piacevole, perchè bisogna respirare i vapori della formalina), si cambia la soluzione e dopo 5-8 gorni l'organo tutto bianco sarà completamente fissato. Allora può essere conservato in una soluzione di formalina al 2 %; oppure, ed è meglio, passato nell'alcool 80 %<sup>1)</sup>.

Il LACHI suggerisce di fare l'indurimento nella formalina al 20 %; probabilmente si tratta di un errore di stampa, e va inteso 2 %.

Il FISH propone questa miscela: formalina 50 g., acqua distillata 2000 g., cloruro di sodio 100 g., cloruro di zinco 15 g.

Mentre la fissazione e l'indurimento dell'encefalo con l'alcool dà per risultato una diminuzione del volume, il bicromato, e più ancora la formalina, danno un notevole aumento. Non bisogna trascurare questo fatto, che potrebbe essere facile causa di errori.

---

<sup>1)</sup> Il LEE (IV ed., p. 396) consiglia, *perchè economico*, il metodo del FISH, il quale esige 400 cc. di alcool a 95 % e 250 g. di glicerina, per la prima fissazione, e poi altri due passaggi in alcool per l'indurimento e la conservazione!!

### IL METODO GOLGI DELL'IMPREGNAZIONE NERA.

**328. Generalità.** — Abbastanza facile nell'uomo e nei mammiferi, più difficile nei vertebrati inferiori, specialmente in quelli di mare, difficilissimo negli invertebrati, tanto che fu detto, erroneamente, che talora è di riuscita impossibile; incerto sempre e limitato nei suoi risultati, il metodo della reazione nera, al quale s'unisce il nome del GOLGI, che lo inventò un quarto di secolo fa, è stato certamente, per lo studio della fina topografia del sistema nervoso, il più importante di tutti.

Non solo molte volte è di riuscita difficile, ma può trarre facilmente in inganno i principianti; esige quindi molta pazienza e prove ripetute. Oltre a ciò vuole essere sempre confrontato con preparazioni identiche, fissate e colorate secondo i soliti metodi.

Malgrado le incertezze e le difficoltà, lo consiglio a tutti quelli che vogliono fare delle ricerche approfondite sulla fina topografia del sistema nervoso centrale; nessun altro metodo può dare, per ora, quel che per questo scopo dà il metodo GOLGI. Con un lungo esercizio si superano le difficoltà e si finisce col riuscire quasi a colpo sicuro, senza bisogno di perder tempo in prove inutili.

Non è poi vero che le preparazioni siano di corta durata; quando sono fatte con diligenza (speciale attenzione si deve avere al rischiaramento delle sezioni nell'essenza di trementina o nel xilolo), durano in buono stato per cinque o sei anni certamente; ed anche di più.

Con un poco di pratica nell'uso del metodo e con le preparazioni di controllo non sarà possibile confondere le fibre o gli elementi nervosi, col tessuto connettivo o con vasi o con fibre muscolari, ecc. <sup>1)</sup>. Del resto, non è mai da una sezione, o da poche preparazioni che si potrà venire ad una conclusione; questa ci può affidare solo quando sia il risultato dell'esame di numerosi e ben riusciti preparati.

Ho detto che questo metodo è il solo che permetta uno studio approfondito della fina topografia nervosa; esso è infatti il solo che ci possa dire che un dato prolungamento nervoso parte dalla *tale* cellula ed arriva fino al *tale* punto; è il solo che ci permetta di distinguere le fibre afferenti dalle efferenti; è il solo che ci possa con tutta certezza indicare le tappe successive e le biforcazioni di una data via nervosa.

---

<sup>1)</sup> Pare impossibile che il LEE abbia riportato nella IV ed. del suo libro una frase scrittagli da un tale, che si vanta « di aver *golgificato* una patata! ». E questa scioccheria è riportata nella traduzione francese (1896) ed in quella tedesca (1898)!

Ma non solamente la topografia, anche l'istologia del sistema nervoso deve molte delle sue importanti scoperte al metodo del GOLGI. Esso ha messo fuori di dubbio la struttura ed il valore cellulare dei granuli, ha stabilito gruppi ben determinati di cellule nell'encefalo, nel midollo e nella retina, ha distinto chiaramente il prolungamento nervoso dai dendriti, e specialmente ci ha rivelato una ricchezza prima neanche sospettata, nelle diramazioni dei prolungamenti nervosi. Basterà ricordare solo questo: uno dei canoni fondamentali dell'istologia del sistema nervoso, prima del metodo GOLGI, era che il prolungamento del DEITERS fosse indiviso.

**329. Critica del metodo Golgi.** — Ad un metodo non si deve chiedere mai più di quello che può dare; questa massima elementare fu anche qui, come sempre, trascurata. E così, mentre il GOLGI rimaneva in prudente riserbo, abbiamo i *golgiani* arrabbiati (a capo dei quali sta RAMON Y CAJAL) che al metodo della reazione nera pretesero chiedere la soluzione dei problemi citologici, dimenticando che l'impregnazione indica le vie nervose, ma non può dire niente sulla intima struttura cellulare e fibrillare, e tanto meno sulle terminazioni nervose, perchè non è già una vera colorazione del tessuto, cioè una combinazione chimica di una sostanza colorante col protoplasma delle cellule e delle fibre; ma una specie di rivestimento, una incrostazione che non è neanche sicuro che sia veramente cromato d'argento, come viene affermato; rivestimento che riempie il vuoto lasciato intorno alla cellula e lungo il decorso della fibra nervosa dall'indurimento col bicromato potassico. Vi fu chi sostenne che si tratti di spazi pericellulari linfatici realmente esistenti, ma siccome con altri metodi di fissazione essi non si scorgono, mentre si vedono sempre quando si adopra il bicromato potassico, è molto più probabile ritenere che siano una produzione artificiale.

Il CAJAL volle ripetere, anche di recente <sup>1)</sup>, che si tratta realmente di un sale, il cromato d'argento, che si diffonde nello spessore del protoplasma; ma sono delle semplici affermazioni, non dimostrate e non dimostrabili. Anzi, con una critica sagace, il KRONTHAL <sup>2)</sup> provò, in modo patente, che effettivamente col metodo GOLGI si ha un ingrossamento degli elementi, dovuto appunto al fatto che il precipitato nero si depone intorno alla cellula; ed ottenne questo risultato scolorando la stessa cellula annerita, che aveva prima misurata e disegnata, e (senza mai muoverla di posto) tornando a disegnarla e a misu-

<sup>1)</sup> *Anatomischer Anzeiger*, 5. J. nota a pag. 86, 1890; *Les nouvelles idées sur la structure du système nerveux*, Paris 1895.

<sup>2)</sup> KRONTHAL P., *Zur Theorie der Golgi'schen Färbung*, Arch. path. Anat. ecc. (Virchow), 130. 1892. p. 233.

rarla dopo averla colorata col blu di metilene. Egli dimostrò anche l'esistenza di figure anulari, che si hanno nelle sezioni trasversali consecutive delle cellule impregnate col metodo del GOLGI, facendo risaltare la insufficienza dei tentativi con i quali il BELMONDO aveva cercato di provare il contrario.

Ma come alle critiche di ROSSBACH e SEHRWALDT <sup>1)</sup>, per quanto ragionevoli e serie, o non fu risposto, o furono contrapposte soltanto delle affermazioni, così agli argomenti del KRONTHAL non fu replicato neanche una parola! Ed è veramente strano che un lavoro pubblicato in una rivista di tanta importanza sia sfuggito all'attenzione degli studiosi <sup>2)</sup>.

Quel che poi è inconcepibile è che nessuno si sia fatto la domanda: ma, se realmente l'impregnazione avviene nell'*interno* delle cellule e delle fibre, come pretende il CAJAL, come va che tutte le cellule e tutte le fibre non s'impregnano contemporaneamente? Come va che il tempo di permanenza nel bicromato ha tanta importanza che, a seconda della maggiore o minore durata della fissazione, si ottiene più specialmente l'impregnazione o delle fibre, o di queste e di alcune cellule, o di alcune forme cellulari in confronto di altre, o di elementi della nevroglia a preferenza di quelli ganglionari? E perchè se si trattasse di una vera impregnazione del protoplasma, si dovrebbe avere la reazione nera anche nella cavità dei canaliculi biliari, degli ultimi dotti glandulari, ecc.?

Questa grande irregolarità nell'impregnazione, che rende il metodo GOLGI così fastidioso da adoprare, e la scarsità degli elementi e delle fibre impregnate, che ne costituisce certamente il più grande e insuperabile vantaggio, mi pare che non si possano spiegare se non ammettendo che dall'azione del bicromato dipende il formarsi degli spazî pericellulari e perifibrari, nei quali si depone il precipitato nero; spazî i quali si formano più o meno rapidamente a seconda della dimensione diversa, e forse anche della diversità di costituzione degli elementi, sui quali agisce in un tempo più o meno lungo il bicromato, od anche sui liquidi pericellulari. Non intendo, del resto, neanche escludere che veri spazî linfatici pericellulari, diversi di dimensione, possano esistere nel tessuto nervoso; spazî che le fissazioni energiche, le quali conducono ad uno stipamento di tutto il tessuto, ci nascondono.

Ad ogni modo, certo è che il metodo GOLGI non è un metodo citologico, e tanto meno un metodo embriologico, come pure hanno

<sup>1)</sup> *Centralbl. f. d. med. Wiss.*, 1888, n. 47.

<sup>2)</sup> Neanche il FRIEDLAENDER, che del metodo GOLGI ha fatto una assai povera e inutile critica, conosce il lavoro del KRONTHAL (*Zeit. wiss. Mikr.*, 12. p. 168, 1895).



preteso tanti, cadendo anche in volgari spropositi. E senza dubbio il più grande peccato del metodo GOLGI, non commesso dal prudente autore, ma dai suoi esagerati seguaci spagnuoli, tedeschi, fiamminghi e italiani, sarà stato quello di aver fatto crescere e allevare il fantastico *neurone*, messo al mondo con pochi fatti e molte ipotesi dall'HIS, battezzato dal WALDEYER, e che per un decennio ha scorazzato nel campo scientifico, per tornare appena adesso nel regno dei sogni e delle supposizioni infondate.

Ma, tenuto conto dei suoi difetti, delle mancanze e delle difficoltà, il metodo GOLGI ci può essere sempre di aiuto prezioso, appunto per la proprietà di dare l'impregnazione nera limitata a pochi elementi e ai loro prolungamenti, mentre tutto il rimanente resta scolorato. Si ottengono così dei preparati di una evidenza e di una chiarezza straordinaria, tanto più che facendo le sezioni di uno spessore rilevante, da 50 a 100 ed anche 120  $\mu$ , i prolungamenti possono essere seguiti per un lungo tratto.

Il metodo GOLGI va suddiviso in tre metodi: lento, rapido e grigio o al sublimato; di quest'ultimo darò le indicazioni seguendo parecchie modifiche introdotte dal COX e da altri. Per quello *rapido* seguirò le norme date dal CAJAL <sup>1)</sup>, che se n'è servito a lungo, e per quello lento mi terrò alle indicazioni del GOLGI, che di tutti e tre ha dato una diffusa descrizione <sup>2)</sup>.

**330. Metodo lento.** — Pezzi di tessuto più freschi che si può, e quindi meglio viventi (ma del resto buoni risultati si possono ottenere anche 24-48 ore dopo la morte), ottenuti con dei tagli netti, e non maggiori di un centimetro cubo, o tutt'al più uno e mezzo, vengono messi nel bicromato potassico al 2%. Il liquido sarà abbondante, 50-60 volte il volume dei pezzi; verrà cambiato di sovente e aumentato il % di sale, portandolo successivamente al 3, 4 e fino 5%. Così si ottiene un più rapido e meglio distribuito indurimento.

La parte più difficile del metodo è quella di determinare la durata più opportuna dell'indurimento; essa varia con la stagione, col volume dei pezzi, con la forza della soluzione, e dipende poi da molte altre circostanze che non possiamo conoscere esattamente.

Bisogna dunque fare molte prove mettendo nel liquido un grande numero di pezzi dello stesso materiale e delle stesse dimensioni. Quanto al tempo, come dati estremi, si può dire che nel pieno estate bastano 15-20 giorni per i primi risultati, e che buone preparazioni si avranno da saggi successivi presi dopo 30, 40, 50 giorni

<sup>1)</sup> *Op. cit.*, p. 176 e seg.

<sup>2)</sup> GOLGI, *Sur l'anatomie microscopique des organes centraux du système nerveux*. Méthodes de recherche. Arch. ital. Biol. 7. p. 15, 1886.

non più. Nell'inverno invece si va dai 2 al 4 mesi, pure tenendo il recipiente coi pezzi su di un tavolo, in vicinanza della stufa che riscalda il laboratorio. Il GOLGI assicura che, per ragioni sconosciute, se l'indurimento si fa a temperatura costante, per esempio dentro un termostato a 20°-25° C., si abbrevia bensì il periodo dell'indurimento, ma non si hanno risultati così delicati e precisi come quando si lasciano i pezzi esposti alle variazioni di temperatura dell'ambiente.

A partire dal tempo minimo, si leveranno due o tre pezzi dal bicromato, in estate ogni 3-4 giorni ed in inverno ogni 8-10; si asciugheranno con carta da filtro e si passeranno nel bagno d'argento.

La soluzione al nitrato d'argento sarà al 0.75 %; se l'indurimento è stato breve e che si vogliono avere risultati più delicati su pochi elementi, si prenderà la soluzione al 0.5 %. Se l'indurimento s'è prolungato, si preferisca quella all'1 %. La quantità di soluzione deve essere piuttosto abbondante (30-40 volte il volume del pezzo), quindi per tre pezzi di un cc. l'uno si prenderà all'incirca 100 cc. di nitrato d'argento.

Appena depositivi i pezzi, il liquido s'intorbida e prende un colore giallo-rosso di cromato d'argento. Si capisce che così il titolo della soluzione è più basso. In questo caso, tanto più se è stata presa in piccola quantità, essa sarà cambiata. Per economia conviene adoprare il sale d'argento che ha già servito una volta per la prima immersione dei pezzi, e dopo pochi minuti questi si passano in altra soluzione fresca. Quando l'indurimento nel bicromato è stato prolungato converrà cambiare una terza volta il bagno d'argento 7-8 ore dopo la seconda. Il recipiente può essere tenuto indifferentemente alla luce o all'oscuro.

I pezzi vanno esaminati 24-30 ore dopo che sono stati immersi; e successivamente si continua fino a 48 ore, che dev'essere considerato come il limite massimo. Del resto i pezzi che non si possono studiare subito possono essere conservati nel nitrato d'argento per dei giorni ed anche per dei mesi, senza che ne risentano alcun danno.

La reazione comincia nelle fibre nervose e si estende a qualche cellula gangliare, dapprincipio la colorazione delle fibre è poco delicata, quasi tumultuaria, poi, in un periodo breve, via via che l'indurimento aumenta, la reazione si fa molto più precisa. Poi s'impregnano le cellule, cominciando da quelle più superficiali e quindi progredendo alle profonde. In un periodo d'indurimento successivo avviene l'inverso: mentre nelle profonde si ha l'impregnazione in quelle esterne essa è sempre più limitata.

Le cellule della nevrogliia si colorano fin dapprincipio, ma in piccolo numero, e continuano anche dopo il periodo più conveniente per le cellule.

Quando, con dei saggi preliminari (facendo dei tagli a mano libera), si è sicuri di avere la reazione al punto desiderato, si levano i pezzi dal bagno d'argento e si passano nell'alcool puro a 80-90 %. Essi devono essere lavati accuratamente, e l'alcool cambiato più volte per lavare il pezzo dal nitrato d'argento esuberante. Nell'alcool, se sono stati bene lavati, i pezzi possono essere conservati per diversi anni in buonissimo stato.

Le sezioni si fanno o a mano o col microtomo, attaccando il pezzo al portaoggetti con un poco di paraffina riscaldata; il coltello si bagna con alcool a 90 %. Poi si depongono le fette nell'alcool assoluto, ed anche qui si cambia il liquido due o tre volte; quindi si rischiera con creosoto, o con essenza di origano, o con olio di garofano. Ciò fatto, si lava accuratamente con olio di trementina o con xilolo, lasciando le sezioni immerse in uno di questi liquidi per un quarto d'ora od anche mezz'ora.

*Dall'accurata lavatura con l'alcool e da quella successiva con la trementina o con xilolo dipende la durata e la chiarezza delle preparazioni.*

Le sezioni, asciugate quasi dall'essenza, si copriranno con della resina d'Ammar (il GOLGI ritiene che questa sia superiore al balsamo del Canada), beninteso dopo che sono già distese a posto sul vetro.

Quest'ultimo non dev'essere un portaoggetti, ma un coprioggetto perchè così, dopo che le sezioni sono bene ricoperte di uno strato *sottile* di d'Ammar (e ciò si ottiene ripetendo due o tre volte l'operazione di versare una goccia di resina sopra ogni fetta, in maniera che, disseccando quella, questa si veda tutta uniformemente lucida e trasparente), il vetro verrà messo capovolto in un apposito portaoggetti di legno, con una finestra nel centro, ed in corrispondenza della quale va a situarsi il coprioggetto, che viene fissato al legno con della lacca bianca sciolta in alcool.

L'utilità di questo modo di preparazione è evidente: le sezioni sono al riparo dalla polvere, pure rimanendo allo scoperto. *È assolutamente necessario, per la loro buona conservazione, che le sezioni preparate coi metodi del GOLGI non vengano chiuse fra due vetri, ma lasciate allo scoperto.*

I preparati si conservano all'oscuro. Come si è già detto, se tutto è stato fatto con diligenza, i preparati saranno chiarissimi per diversi anni. Anche quando poi finissero con l'oscurarsi (ciò che succede a cominciare dal tessuto a contatto con l'elemento impregnato), possono essere rimessi in buono stato prendendo il coprioggetto con le sezioni ed immergendolo in abbondante quantità di trementina o di xilolo, e lasciandovelo fino a tanto che tutta la resina s'è disciolta. Allora lo si passa in un altro bagno di xilolo o di tremen-

tina pura, dove rimarrà per 24-48 ore. Estratto ed asciugato, si copriranno le sezioni con la resina, seguendo le norme già date.

**331.** Uno dei maggiori inconvenienti del metodo è il depositarsi di una grande quantità di cristalli di cromato d'argento, che formano una crosta alla superficie del pezzo e che molto spesso penetrano anche nell'interno. Sono stati proposti molti rimedi, ma tutti poco efficaci. Chi involge il pezzo, prima di metterlo nel bagno d'argento con carta da sigarette, o con *water-closet paper* o con pezzi d'ostia inumiditi; chi con la pellicola resistente che sta subito al disotto del guscio delle uova di gallina. Chi asciuga il pezzo ben bene, lo immerge per una mezz'ora nell'alcool assoluto ed etere a parti eguali quindi lo riveste con celloidina, e, quando questa è asciutta, lo passa nel sale d'argento. Chi, infine, fa il rivestimento con la gelatina. Ma tutti questi ed altri espedienti sono di una efficacia molto relativa; possono al più diminuire il precipitato periferico, ma non già impedire quello che si forma nell'interno.

In generale non si fa alcun rivestimento del pezzo da tagliare, perchè ciò non è necessario, trattandosi di fare grosse sezioni. Ma volendo, si possono fare i rivestimenti con la celloidina ed anche con la paraffina. Per quest'ultima sarà tuttavia prudente di operare con rapidità, e tenere i pezzi poco tempo nella stufa, servendosi di una paraffina tenera (45°-50° C.), per non far sopportare al pezzo una temperatura troppo elevata. Le fette si faranno sempre col coltello bagnato con alcool forte a 80-90 %.

**332. Metodo del Golgi rapido.** — Molto più comodo del precedente, secondo il CAJAL dà una maggiore delicatezza nell'impregnazione; è da preferire a quello lento, perchè più breve e di più facile riuscita.

I pezzi vengono messi nel bicromato potassico per un giorno, e poi passati nella seguente miscela: bicromato potassico al 3 % parti 4, acido osmico all'1 % parti 1, dopo due, tre e quattro giorni si passano asciugandoli prima con carta da filtro, nel bagno d'argento a 0.75 % e si tagliano, da un giorno e mezzo in avanti.

Il CAJAL, che ha lavorato per molti anni col metodo rapido, dà indicazioni importanti, delle quali sarà bene tener conto, per non fare prove inutili, ed ha introdotto al metodo originale del GOLGI alcune varianti. Ecco, con le sue stesse parole, come egli procede <sup>1)</sup>:

1.° Si tagliano con le forbici o col rasoio, dei pezzetti di 4 mm., al più, di lato, del tessuto nervoso da studiare; e s'immergono per 24, 48 o 56 ore nella miscela seguente: bicromato potassico g. 3, acqua distillata g. 100, acido osmico 1 % cc. 30-35.

<sup>1)</sup> CAJAL, *op. cit.* e: *Elementos de Histologia normal y de Tecnica*, Madrid 1897.

La quantità di liquido dev'essere proporzionale al numero dei pezzi immersi, circa 10 cc. per ogni pezzetto. Fa lo stesso tenere il recipiente all'oscuro o alla luce. La temperatura più favorevole è fra 20°-25° (centigradi?); nondimeno si possono avere buoni risultati anche a 8°-9°, ma allora occorre un tempo più lungo.

2.° I pezzi, tolti dal fissatore; si lavano rapidamente con acqua distillata, e s'immergono in una quantità abbondante (quanto?) di soluzione di nitrato d'argento al 0.5 o al 0.75 %, e vi si lasciano da 24 ore fino a parecchi giorni. Di solito noi li togliamo dopo 36 ore.

Quando si tratta di cervelli o di midolli giunti quasi a completo sviluppo si aggiungono al nitrato d'argento una o due gocce di acido formico ad ogni 200 gr. di liquido. Sembra che così si ottenga maggiore estensione nell'impregnazione e che si dia maggior chiarezza al fondo della preparazione <sup>1)</sup>. Ma nei tessuti di difficile impregnazione, come sarebbero quelli embrionali, non si ha alcun vantaggio con l'uso dell'acido formico.

L'influenza della luce e della temperatura, durante il bagno nel sale d'argento, sembra nulla. Di solito i pezzi son tenuti al chiaro e alla temperatura ordinaria; ma è utile tenerli all'oscuro, se le sezioni vanno fatte parecchi giorni dopo l'immersione nel sale d'argento, altrimenti, dopo 3 o 4 giorni, si formerebbero riduzioni irregolari nell'interno del pezzo, come ha notato VAN GEHUCHTEN.

3.° Per fare le sezioni, che devono essere assai grosse (quanto?) perchè si possano seguire gli elementi sul più lungo tratto possibile, si pongono i pezzi fra due mezzi midolli di sambuco o di sughero, dopo averli rivestiti superficialmente di celloidina o di paraffina, e si taglia con un microtomo.

Ecco come si procede: si disidrata la superficie del pezzo immergendolo nell'alcool a 95 % per un paio di minuti, e si pone sopra un pezzo di paraffina dura. Con un ago o un bisturi, riscaldato alla fiamma, si fonde rapidamente la paraffina tutto in giro alla parte inferiore del pezzo, in modo di fissarlo solidamente. Questa manovra va fatta con molta rapidità, per non disseccare il pezzo. Si immerge nell'alcool a 95 % e poi si mette sul microtomo. Il coltello si bagna con lo stesso alcool.

4.° Le sezioni si pongono nell'alcool a 95 %, e si passano in cinque o sei bagni di questo alcool, tenendovele per non più di una ora, altrimenti l'alcool scolorirebbe le fibrille più sottili.

5.° Le sezioni tolte dall'alcool si tengono per non più di mezz'ora in un bagno di essenza di garofano.

---

<sup>1)</sup> Da altri fu proposta l'aggiunta della formalina, ma credo che tanto questa che l'acido formico non siano realmente di nessuna utilità.

6.° Si pongono sul portaoggetti <sup>1)</sup>, si toglie l'eccesso di essenza con della carta da filtro, che si preme moderatamente sulle sezioni e si versa su di esse qualche goccia di xilolo, per levare tutta l'essenza.

7.° Dopo fatto sgocciolare il xilolo mettendo il vetro verticalmente, si coprono le sezioni con una soluzione poco densa di gomma d'Amman nel xilolo, si aggiustano con un ago mettendole in righe parallele e si lasciano seccare al riparo dalla polvere. Dopo una o due ore, quando il primo strato di resina è quasi asciutto, si copre con un secondo, poi un terzo, ecc. finchè le sezioni, completamente ricoperte, mostrano una superficie liscia.

Non si devono ricoprire le preparazioni col coprioggetto, perchè così si altererebbero in poco tempo. Sembra che ciò dipenda, stando al SAMASSA, dal prodursi di correnti di diffusione, che tolgono il cromato d'argento agli elementi impregnati.

Bisogna dunque lasciare le preparazioni allo scoperto. Questo è un inconveniente che esige delle precauzioni per la conservazione. Quando la resina è secca, si mettono le preparazioni allo scuro e riparate dalla polvere <sup>2)</sup>.

Con tutto ciò la loro conservazione non è perfetta, e dopo due o tre anni il fondo della preparazione prende un colore più scuro e il cromato d'argento si diffonde intorno agli elementi impregnati. Ciò non vuol dire che la preparazione sia perduta, sono solo diminuite la bellezza e la chiarezza, ma con un potere illuminante maggiore potranno essere sempre studiate. In generale più una fetta è grossa e meno durerà. Le fette di una sottigliezza media (quanto?) sono quelle che si sono potute conservare inalterate per più di 4 anni.

Furono escogitati diversi procedimenti per mantenere le preparazioni del GOLGI. Trattando le fette con l'acido bromidrico (GREPPIN) o col cloruro d'oro (OBREGIA), si conservano realmente ben colorati i corpi cellulari e i dendriti, ma le fine fibrille del cilindrasse impallidiscono od anche si scolorano completamente.

In conclusione, le condizioni per una buona conservazione delle sezioni sono le seguenti; sezioni non troppo grosse <sup>3)</sup>, lavatura accurata nell'alcool, per levare completamente il nitrato d'argento; dis-

<sup>1)</sup> Come ho già detto, è preferibile di mettere le sezioni sul coprioggetti, per tenere poi questo rovesciato sugli appositi portaoggetti di legno.

<sup>2)</sup> È preferibile adoperare una resina densa, che si liquefa bene al momento di servirsi con un leggero riscaldamento a bagnomaria, e mettere le fette sul coprioggetti. Così le preparazioni si possono riporre con sollecitudine, togliendole dalla polvere e dalla luce, ed rovesciare il vetrino sul portaoggetti di legno.

<sup>3)</sup> Il CAJAL non dice mai lo spessore delle sezioni; in generale, per sezioni medie, si può intendere quelle grosse da 40 a 60  $\mu$ .

seccamento completo delle fette sotto uno strato sottile di balsamo d'Ammonio; conservazione allo scoperto e all'oscuro.

**333. Processo della doppia impregnazione** <sup>1)</sup>. — I pezzi, levati dal bagno d'argento ed asciugati con carta da filtro, si pongono in una miscela osmio-bicromica simile alla prima, oppure più ricca in bicromato, vale a dire: bicromato potassico 6-7 g., H<sup>2</sup>O 100 cc., acido osmico 1 % 30-35 cc., e vi si tengono per 1-2 giorni. Se si teme che i pezzi s'induriscano troppo e divengano fragili, basterà diminuire la quantità di acido osmico.

Si levano i pezzi dal miscuglio, si asciugano e si mettono per 24 ore nel solito bagno d'argento.

Se le preparazioni sono ben riuscite, le cellule e le fibre nervose compaiono colorate nettamente, risaltando sopra un fondo giallo chiaro. Le cellule e i grossi dendriti sono neri, i prolungamenti nervosi bruni o bruno-rossastri e le più sottili collaterali rosso-giallastre. Le cellule di nevroglia sono di solito rossocupe, ma non di rado anche del tutto nere.

Il cromato d'argento non si depone alla superficie della cellula, come ROSSBACH e SEHRWALDT hanno affermato, ma si diffonde nello spessore del protoplasma <sup>2)</sup>.

Quando si tratta di cellule con poco protoplasma il nucleo diventa visibile risaltando col suo colore caffè sul fondo nero.

**334. Regole relative all'uso del metodo rapido**, che possono servire di guida a coloro che desiderano adoperare il metodo GOLGI, risparmiandosi molte noie e inutili tentativi.

1. Il metodo GOLGI non dà risultati costanti ed assolutamente dimostrativi negli organi nervosi che nel periodo vicino all'apparire della mielina. Se l'età dell'animale precede di molto la fase della midollizzazione, o se corrisponde, al momento in cui le guaine midollari sono formate, la colorazione delle cellule e delle fibre è molto incostante.

2. Non tutti gli organi nervosi s'impregnano con la stessa facilità. Le nostre numerose esperienze ci permettono di ordinare così le diverse porzioni del sistema nervoso secondo la loro costanza di impregnazione: corno d'Ammonio di coniglio di 8 giorni <sup>3)</sup>; cervello dello stesso; midollo di pollo dal 7° al 14° giorno dell'incubazione.

<sup>1)</sup> Questa modificazione, dovuta al CAJAL, è di una grande utilità quando si tratta di materiale difficile, che resiste ad una semplice impregnazione. Per la doppia impregnazione è meglio che il primo indurimento sia piuttosto prolungato, specialmente se si tratta di materiale embriologico.

<sup>2)</sup> Questa asserzione del CAJAL non è attendibile, come ho detto più sopra, p. 243.

<sup>3)</sup> Anche con materiale di gatto neonato si ha con costanza e facilmente la reazione nera.

Queste tre parti si colorano con la maggior costanza e in modo dimostrativo.

Con questi organi dovranno dunque famigliarizzarsi i principianti; in seguito potranno studiare con profitto parti più difficili. Aggiungiamo che per avere delle preparazioni perfette, bisogna arrivare a determinare queste due condizioni: 1.° quantità della miscela fissativa; 2.° tempo della fissazione.

Il bulbo olfattivo del coniglio, del cane e d'altri animali giovani e il cervelletto di neonati (cavie di 8 giorni, coniglio e topo di un mese, ecc.) vengono in seconda linea. In questi organi la reazione, pure essendo completa, è meno costante che nei precedenti.

Devono essere considerati come organi difficili i gangli simpatici, la retina, la mucosa olfattiva, le terminazioni nervose e sensitive, le terminazioni del labirinto, ecc.

3. Per ottenere dei buoni risultati, si deve curare la scelta dell'animale. Le dimensioni dell'organo e i suoi rapporti con gli altri (e forse anche certe particolarità chimiche sconosciute) favoriscono o contrariano la reazione, evitano o aumentano i depositi irregolari. Per esempio, la retina s'impregna meglio negli uccelli e nei rettili che non nelle altre classi di vertebrati. Il cervello di coniglio di 8 giorni molto più facilmente di quello degli altri soliti roditori, del cane, ecc., anche se questi, per età, corrispondono alla medesima fase evolutiva dell'organo. Il midollo spinale degli embrioni di uccello (pollo) prende meglio il cromato d'argento di quello dei mammiferi e dei rettili; il lobo ottico degli uccelli meglio assai dei corpora quadrigemina dei mammiferi, ecc.

4. Quanto più l'organo è embrionale e meno tempo sarà lasciato nel fissativo. Esempi: midollo di pollo dal 5° al 6° giorno 24 ore; idem dal 14° al 15° giorno tre giorni. Cervelletto di coniglio neonato 24 ore, coniglio di un mese da 2 a 3 giorni, ecc.

5. Per quanto è possibile l'organo da fissare si tenga involuppato da una piccola porzione dei tessuti circostanti. È il modo migliore per evitare i depositi irregolari alla superficie. Per esempio nel midollo di pollo di pochi giorni si lascia tutta la colonna vertebrale. Nel cervello la pia madre sarà sempre lasciata in posto. Talvolta, come consiglia SEHRWALD, è utile un rivestimento di gelatina prima di passare nel bagno d'argento.

6. La fissazione sarà *insufficiente* quando le sezioni mostrano un fondo rosso uniforme con cellule e fibre impregnate incompletamente. La fissazione sarà *troppo prolungata* quando il fondo sarà giallo chiaro senza cellule e con poche fibre.

7. Il pezzo è fissato *un poco di più* quando mancano le cellule e abbondano le fibre. Questo difetto si corregge con una seconda impregnazione. E questa si applicherà sempre, ed anche una tripla, per



gli organi difficili: retina, gangli simpatici, ecc. È rarissimo ottenere una colorazione completa con una sola impregnazione.

8. Le condizioni dell'impregnazione che occorre determinare sono numerose, specialmente quando si devono studiare questioni nuove. E allora bisogna procedere per tentativi successivi. Si divide l'organo in diversi pezzi e per ciascuno di essi si varia il tempo della fissazione, che è la parte essenziale del metodo GOLGI. Si lascerà un pezzo 24 ore, un altro per 36 e poi di seguito 48, tre, quattro, cinque giorni. Poi a tutti i pezzi si farà la doppia impregnazione ed anche la tripla. Si arriverà così a determinare le migliori condizioni di riuscita per un dato organo: ma non si dovrà mai dimenticare che nell'apprezzarle molto dipenderà dall'esperienza e dall'abilità dell'operatore; *il principiante non spera di ottenere lo scopo se non dopo parecchi mesi di tentativi numerosi e perseveranti.*

Del resto, ciò che succede col metodo GOLGI è successo con quello del cloruro d'oro; difficile e quasi impossibile per i principianti, ha dato splendidi risultati nelle mani di GERLACH, di LÖWIT, di GOLGI, ecc.

9. Due circostanze hanno speciale importanza. Il cromato d'argento non impregna contemporaneamente che poche cellule e poche fibre, e accade spesso di vedere ad un tratto delle cellule splendidamente colorate, malgrado che per mesi e mesi avessero resistito all'impregnazione. Bisogna quindi ripetere e ripetere molte volte le preparazioni. Si ottiene in questa guisa di stabilir bene la struttura dell'organo, mercè quel poco che volta per volta si è potuto vedere; e d'altronde il ripetersi di un particolare istologico in molte preparazioni ben riuscite è la migliore garanzia della sua realtà. Si evita così di considerare come realmente appartenente alla struttura di un organo una disposizione casuale, dovuta al capriccio di un'impregnazione incompleta, disposizione che molto spesso è creduta definitiva e costante dagli osservatori inesperti.

10. Si devono sempre confrontare le preparazioni del metodo GOLGI con buone sezioni degli stessi tessuti adulti, colorati col metodo WEIGERT-PAL, o col carminio, coi colori d'anilina, ecc.

Le preparazioni col metodo WEIGERT, oltre al decorso ed alla posizione delle fibre, mostreranno se queste sono o no midollate, e condurranno spesso a cercare, col metodo GOLGI, le proprietà dei tubi nervosi che non s'impregnano con i primi tentativi.

Le preparazioni col carminio, l'ematossilina ed i colori d'anilina daranno un'esatta conoscenza sulla situazione e natura delle cellule impregnate col metodo GOLGI; esse mostreranno pure i corpuscoli che il cromato d'argento non ha colorato, e spingeranno così a fare nuove prove.

**335. La reazione nera e la nevroglia.** — Se basta una piccola espe-

rienza per non confondere le fibre nervose con fibre connettivali, o muscolari, o con ramuscoli sanguigni, ben diversa è la cosa quando si tratta di differenziare gli elementi ganglionari da quelli della nevroglia. Se, nel maggior numero dei casi, la caratteristica forma degli astrociti fa sì ch'essi si distinguano facilmente dalle cellule nervose, vi sono dei tessuti embrionali, specialmente nei vertebrati inferiori, che possono indurre in errore.

Più d'uno ha cercato di stabilire se l'impregnazione ha luogo in tempi diversi nelle cellule nervose ed in quelle della nevroglia; e sebbene non si abbiano dati sicuri, è ritenuto in generale <sup>1)</sup> che gli astrociti si mettono meglio in evidenza quando si è accorciato il periodo dell'indurimento. Così ho notato anch'io in embrioni di *Mustelus*, e così ritiene il LUGARO. In generale un bagno osmio-bicromico di 24 ore è sufficiente per mostrare le cellule della nevroglia, mentre con questa breve fissazione non si ha l'impregnazione delle cellule e delle fibre nervose.

**336. La reazione nera nei vertebrati inferiori e negli invertebrati.** — Come ho detto dapprincipio, il metodo GOLGI riesce più difficilmente nei vertebrati inferiori, e speciali difficoltà presentano i pesci di mare; ma anche qui è questione di tempo e di pazienza. Con le doppie e triple impregnazioni, ricorrendo ad animali molto giovani, si riuscirà ad avere delle buone preparazioni.

Le difficoltà aumentano quando scendiamo agli invertebrati. Il KÉNYON, nel suo studio sul cervello delle api (cap. XXV), dichiara di non avere avuto risultati positivi che quindici-venti volte su cento, cioè una volta su sei. Il RETZIUS non è riuscito ad impregnare le terminazioni sensoriali dei molluschi che in due sole specie di polmonati terrestri. Tuttavia anche qui sono convinto, per la mia propria esperienza, che l'impregnazione riesce sempre, su qualunque animale. Così io ho avuto la reazione con doppia impregnazione nel mantello delle ostriche e nel cervello dei cefalopodi. Del resto, per questi ultimi, consiglio di preferire il metodo COX, che non è che una modificazione di uno del GOLGI.

**337. Reazione nera col metodo Golgi-Cox, modificato.** — Ecco le indicazioni precise di questo metodo che ho sperimentato ripetutamente.

Pezzi freschissimi vengono immersi in questa miscela: bicromato potassico 5 %, parti 20, bicloruro mercurico 5 % parti 20, acqua distillata parti 30-40, cromato potassico 5 % parti 16. Va notato che

---

<sup>1)</sup> LENHOSSÉK, *Der feinere Bau des Nervensystem im Lichte neuester Forschungen*, II ed., p. 11, Berlin 1895; OYARZUM, *Ueber den feineren Bau des Vorderhirns der Amphibien*, in *Arch. mikr. Anat.*, 35. 1890; CATOIS, *La nèvroglie de l'encéphale chez les poissons*, in *Comptes Rendus*, 126. p. 433, 1898.

anche questa, come tante altre formule di miscele istologiche, è chimicamente assurda; le diverse quantità sono state prese, così come sono, a casaccio, tanto è vero che non tutto si scioglie, e che occorre lasciare riposare e filtrare <sup>1)</sup>, dopo avere agitato ripetutamente.

I pezzi possono essere anche di 7-8 mm. di spessore, e forse anche di un centimetro, e devono essere lasciati nel liquido da uno a due mesi, meglio da uno e mezzo a due e mezzo nell'estate, da 4 a 5 nell'inverno. Con un termostato, tenuto a 30°-35° C., si può abbreviare questo secondo periodo. Il liquido sarà piuttosto abbondante, 50-60 volte il volume del pezzo.

I pezzi si lavano, dopo asciugati con carta da filtro, nell'alcool a 95 % per alcune ore, poi si mettono nell'alcool assoluto, quando occorre fare il rivestimento con paraffina o con celloidina, altrimenti dall'alcool a 95 % si mettono sul microtomo e si tagliano col coltello bagnato nello stesso alcool. Se si devono rivestire con celloidina, si passano dall'alcool assoluto nell'etere ed alcool assoluto parti eguali e poi nella celloidina. Se si preferisce rivestire con paraffina, si levano dall'alcool assoluto e si asciugano con carta da filtro; si tengono per un quarto d'ora nella trementina e poi si versano nella paraffina ben calda (60-70° C.), facendo così un rapido rivestimento esterno. È inutile che la paraffina penetri all'interno. Le sezioni si fanno anche in questo caso col coltello ed il pezzo bagnati nell'alcool a 95 %. Se occorre fette sottili, si faranno da 30 a 40  $\mu$ , se grosse da 60 a 100. Dall'alcool le sezioni si mettono nell'acqua distillata e poi, per 5-10 minuti, in una soluzione al 3 % di potassa caustica. Si lavano a lungo e ripetutamente nell'acqua distillata, in modo da togliere qualunque traccia di alcalinità, si passano nell'alcool a 70, poi a 95 %, nell'olio di origano o di bergamotto (o, se non sono state messe in celloidina, anche di garofano); e quando sono bene rischiarate si pongono nel coprioggetto e si stendono in file ordinate. Poi si lavano bene con trementina o con xilolo, in modo che tutto il rischiarante se ne vada; quando sono quasi asciutte, si ricoprono con la resina d'Ammar sciolta in xilolo o in trementina. I preparati vanno tenuti all'oscuro e al riparo della polvere.

Con questo metodo si hanno preparati di una bellezza straordinaria, perchè sono evitati i precipitati di cromato d'argento del metodo GOLGI. Il fondo poi è di una tinta così chiara (quando il rischiaramento è fatto con molta cura) da potersi dire bianca.

---

<sup>1)</sup> Il CAJAL (*op. cit.*, p. 185) aggiunge un altro errore dicendo che il cromato potassico dev'essere a reazione fortemente alcalina.

In generale il metodo GOLGI-COX modificato è di riuscita più sicura dei due metodi GOLGI al sale d'argento.

Una cosa che non s'impara che con la pratica è quella di determinare bene la durata della fissazione; se questa viene prolungata, si ha l'impregnazione di un troppo gran numero di fibre ed anche di cellule. La grande chiarezza del fondo permette con questo metodo di fare delle doppie colorazioni adoperando il carminio o l'ematoxilina.

Un inconveniente è che non si ha una buona reazione con gli elementi molto piccoli. In questo caso si darà la preferenza al metodo rapido del GOLGI e alle doppie e triple impregnazioni secondo il CAJAL.

La durata delle preparazioni è anche maggiore di quella dei preparati impregnati col cromato d'argento.

**338. Metodo del ringiovanimento, secondo Golgi.** — Qualche accenno si trova in un lavoro del MARTINOTTI (1894) e di recente lo stesso GOLGI <sup>1)</sup> ne ha detto qualche cosa, ma in modo poco preciso. Con la parola *ringiovanimento* l'autore intende un trattamento speciale da farsi ai pezzi che, essendo stati abbandonati per lungo tempo nel fissativo osmio-bicromico, non si presterebbero più per la reazione col sale d'argento.

I pezzi, levati dal fissativo, sono immersi per uno-tre giorni in una soluzione di acido arsenico ( $\text{AsO}_5$ ) 1-2 %, oppure di acetato o di solfato di rame 3-4 %. Quindi si rimettono per tre-cinque giorni nel fissativo osmio-bicromatico, od anche per quattro-dieci giorni nel solo bicromato potassico 3 %.

Per il preteso rivestimento neuro-cheratinico delle cellule nervose e dei dendriti il GOLGI (l. c.) ha avuto i migliori risultati dal metodo rapido, e quando l'indurimento era troppo prolungato alcalinizzava la soluzione osmio-bicromica aggiungendo una soluzione al 10 % di fosfato sodico. Dopo qualche giorno d'immersione passava nel bagno d'argento.

### METODI WEIGERT, PAL, MARCHI.

**339. Metodo Weigert.** — Importantissimo per lo studio dei tratti midollati (non è quindi un metodo embriologico), dà un distinto differenziamento fra le due sostanze grigia e bianca del tessuto nervoso. Fino a pochi anni or sono, quando cioè il metodo GOLGI era poco diffuso, i migliori lavori di topografia nervosa furono fatti con la

---

<sup>1)</sup> In *Arch. Ital. Biol.*, 30. 1898, p. 69.

colorazione del WEIGERT, la quale è di sicura riuscita e dà preparazioni molto dimostrative.

Il metodo WEIGERT non serve per lo studio istologico, ma solo per quello topografico di un dato territorio dei centri nervosi.

Nel 1885 il WEIGERT pubblicò il suo primo metodo, caduto ora in disuso. Pochi anni dopo il PAL lo modificò, ed è questo che, acquistata moltissima voga, va sotto il nome di WEIGERT-PAL. Finalmente il WEIGERT stesso, nel 1891, diede un nuovo metodo. Sono questi due ultimi ch'io descriverò.

**340. Weigert 1891.** — I pezzi sono induriti nel bicromato potassico al 3 e fino al 5 %; non occorre che siano piccolissimi. Quando sono induriti bene (da 3-4 giorni a 10-15, secondo la stagione) si lavano nell'acqua a lungo, poi si passano negli alcoli, nell'alcool assoluto ed etere, nella celloidina, e si fa il rivestimento. I blocchi in celloidina sono messi in una soluzione satura di: acetato neutro di rame parti 1 e sale di Seignette (tartrato sodico potassico) soluzione acquosa al 10 % parti 1. Si lasciano per 24 ore in un termostato alla temperatura di 15°-30° C.; poi per altre 24 ore nella soluzione di acetato neutro di rame sola. Si tolgono dal termostato, si lavano con acqua, si passano nell'alcool a 80 %. Le fette si fanno di 20  $\mu$  di spessore (se sono più grosse, è più difficile ottenere la differenziazione).

La colorazione si fa nel modo seguente. Si prepara una soluzione satura di carbonato di litina, e con 7 cc. di essa in 93 cc. di acqua distillata si ha il liquido da aggiungere in ragione di 9 volumi per 1 della soluzione colorante ottenuta sciogliendo 1 g. di ematossilina in 10 cc. di alcool a 90 %. La sostanza colorante deve essere fresca, perchè si altera presto.

Le sezioni sono lasciate nella soluzione per 12-24 ore, e dopo lavate in molt'acqua, passate negli alcoli, rischiarate con olio di anilina parti 2, xilolo parti 1; quindi xilolo puro e chiuse nel balsamo sciolto nel xilolo, e non già nel cloroformio, che sarebbe di danno alla colorazione.

Le fibre midollate compaiono di un blu intenso su di un fondo chiaro.

Il WEIGERT, per ovviare all'inconveniente che le preparazioni si alterino presto, propose di far seguire alla colorazione il bagno nel ferrocianuro potassico<sup>1)</sup>, usato nel metodo vecchio (ferrocianuro g. 2.5, borace g. 2, acqua cc. 200), lasciandovi le sezioni fino a tanto che, esaminandone qualcuna nell'acqua, si scorge distintamente un buon

<sup>1)</sup> Prussiato rosso.

differenziamento sul fondo grigio-giallastro. Allora si lavano, si passano negli alcoli, ecc.

**341. Weigert-Pal.** — Si induriscono i pezzi nel bicromato e si fa il rivestimento in celloidina, quindi (senza fare il bagno col sale di rame) si tagliano le sezioni e si colora con l'ematossilina, come col metodo WEIGERT, e si lavano nell'acqua, che si rende leggermente alcalina con l'aggiunta di qualche goccia di soluzione di carbonato di litina. Poi si tengono per mezzo minuto nella soluzione di permanganato potassico a 0.25 %, si lavano e si colorano nella soluzione seguente: acido ossalico 1, solfito potassico 1, H<sup>2</sup>O 200. In pochi secondi la sostanza grigia è scolorata, mentre quella bianca conserva il colore blu. Si lava bene in acqua; volendo, si fa una doppia colorazione con l'eosina o con la fucsina acida, e si disidrata.

Questo metodo è più incerto, ma molto più rapido di quello originale del WEIGERT.

**342. Metodo Marchi.** — Serve per lo studio delle degenerazioni dei nervi, e quindi ha una larga applicazione nelle ricerche sperimentali; è un metodo semplice e che dà risultati certi ed evidenti.

Si fissa il pezzo di nervo nel liquido del MÜLLER per una settimana, ed anche più. Poi si passa per qualche giorno in una miscela di liquido del MÜLLER parti 2 e acido osmico all'1 % parti 1. Con questo trattamento il tratto degenerato mostra la mielina annerita dall'acido osmico, mentre le porzioni normali rimangono di color giallo.

**343. Metodo Paladino** <sup>1)</sup>. Piccoli pezzi, di mezzo centimetro di spessore, sono induriti nel sublimato saturo, o in un composto del cromo (acido cromatico, bicromato potassico, idem d'ammoniaca); di solito nel bicromato potassico dal 2 al 4 %, o nel liquido del MÜLLER. Si lava in acqua corrente e si disidrata con ripetuti passaggi nell'alcool ordinario, e poi a 96 %. Per levare la parte solubile della mielina si trattano i pezzi a caldo con un miscuglio di alcool assoluto e benzolo, poi benzolo solo e quindi alcool assoluto solo, od anche a 96 %. Quest'operazione deve durare un'ora per ciascun bagno. Dopo la *smielinizzazione*, i pezzi si passano nel cloruro di palladio 1-2 per mille; il liquido dev'essere preso in grande quantità e leggermente acidulato con qualche goccia di HCl; verrà anche cambiato 1-2 volte. Col materiale embriologico la soluzione sarà più allungata: 0,75 per mille. Il bagno nel cloruro di palladio va prolungato anche per più di una settimana, finchè la soluzione non si scolora più; allora si è certi di una completa impregnazione.

Ottenuta questa si passano i pezzi nella soluzione acquosa di joduro potassico al 4 %; forse meglio, per sorvegliare più facilmente la riduzione, adoperare una soluzione più allungata, anche all'1 %. Se ne prende poca quantità, e non si cambia mai, finchè vi sono i pezzi; a seconda del loro spessore vi dovranno restare per 2-24 ore. Si lava, si passa negli alcoli e si fa il rivestimento in celloidina, lasciando i pezzi in quest'ultima per diversi giorni.

<sup>1)</sup> *Arch. ital. Biol.*, 22. p. 40, 1894.

Se si tratta di midollo umano lo spessore dei pezzi non deve superare i 4 mm.; per un emimidollo non si oltrepasserà i 6 mm.

Il vantaggio del metodo è di permettere contemporaneamente lo studio degli elementi ganglionari e di quelli della nevroglia. Io non me ne sono mai servito, nè ho avuto occasione di giudicare della sua importanza, che probabilmente non è grande.

### METODI AL BLU DI METILENE.

**344. Generalità.** — Adoperato di preferenza per i nervi periferici e per alcune terminazioni, metto qui il metodo della così detta iniezione vitale, perchè può servire negli studi d'insieme del sistema nervoso, specialmente di animali inferiori. Il metodo fu scoperto da EHRlich (1886), che, iniettando del blu di metilene in soluzione allungata ad animali viventi e poi sacrificati, vide gli elementi nervosi colorarsi intensamente quando gli altri tessuti erano ancora scolorati. Da qui l'errore di crederla una colorazione vitale; ma sta in fatto che, come sempre, anche in questo caso gli elementi non si colorano finchè sono viventi, e che appena morti e messi in contatto dell'aria (per azione non dell'ossigeno, ma delle piccole tracce di ammoniaca che vi sono disciolte, come sostiene l'APATHY), quelli del tessuto nervoso si colorano prima degli altri, probabilmente perchè sono i primi a morire. Ed ecco subito uno degli inconvenienti del metodo: la difficoltà di determinare il momento nel quale si deve sospendere, fissandola, la colorazione; sì che essa si limiti al solo tessuto nervoso. Quindi le incertezze e le difficoltà del metodo, che, come tutti i metodi speciali, può dare delle preparazioni splendide, ma può anche fallire, oppure far cadere gli osservatori poco esperti in gravi errori. E più d'una volta sono state descritte cellule e fibre del connettivo per elementi nervosi!

Il blu di metilene è stato preferito ad altri colori basici perchè è una delle aniline meno velenose, di modo che può essere iniettato anche in quantità relativamente grande nell'animale vivente e non cagionare la morte che dopo alcune ore dall'iniezione; così il colore ha il tempo di diffondersi per tutto l'organismo.

A differenza del metodo del GOLGI, il blu di metilene non dà una semplice incrostazione, ma una vera colorazione del protoplasma. Con tutto ciò la colorazione ottenuta con l'iniezione vitale non è una colorazione precisa e differenziale; quindi neanche questo metodo può dirsi citologico, ma piuttosto topografico. E, come quello del GOLGI, non è da consigliare ai principianti, ma solo a chi è esperto nella tecnica ed ha già una buona conoscenza dell'istologia nervosa. *Anche qui sono necessari i preparati di controllo.*

Un'altra difficoltà del blu di metilene era quella della conservazione dei preparati; ma oggidi su questo punto si sono ottenuti

notevoli progressi, specialmente per merito del BETHE, i metodi del quale, con alcune modificazioni, ora esporrò.

**345. Metodo Bethe** <sup>1)</sup>. — Si fa la colorazione vitale o con le iniezioni sottocutanee, o iniettando nel circolo, oppure, se si tratta di invertebrati acquatici, mettendo il blu di metilene nell'acqua (esso si scioglie bene anche in quella salata). Le indicazioni della forza della soluzione e della scelta del modo di fare le iniezioni variano a seconda dell'organo da studiare. Così, per es., il SEMI MEYER <sup>2)</sup>, per il sistema nervoso centrale dei mammiferi, preferisce le iniezioni sottocutanee: per un topo 5 cc. di una soluzione all'1 ‰, 40 cc. per un coniglio neonato, 120 cc. per un gatto. La dose dev'esser data in parecchie volte e ad intervalli di qualche ora.

L'EHRlich usava soluzioni più allungate, 1 a 300. Il CAJAL <sup>3)</sup>, per lo studio della retina del pollo o del piccione, preferisce l'iniezione per la carotide di 2-3 cc. di soluzione all'1 ‰. In alcuni casi il S. MEYER ha adoperato perfino la soluzione satura a caldo (37° C.). Ad ogni modo, bisognerà regolarsi a seconda degli animali, procedendo con metodo proprio.

Nelle rane si preferisce l'iniezione nel sacco linfatico di 5 cc. ogni mezz'ora, per 5-6 ore. Il BETHE nei crostacei leva porzione del guscio del dorso e versa dentro il liquido, ripetendo l'operazione due o tre volte. Nelle sanguisughe si apre l'animale dal dorso, si leva l'intestino e, scoperta la catena ganglionare, vi si versa un po' di liquido per mezz'ora.

Quanto al tempo, in generale si tengono gli animali finchè finiscono di vivere avvelenati dal blu di metilene; ciò che succede dopo 2-24 e più ore.

Tolto l'organo all'animale, se questo è morto non sarà neanche necessario tenerlo esposto all'aria inumidita. Qui è da ricordare che se il pezzo rimane a lungo nel cadavere, od anche, dopo estratto, all'aria, non si ha più la colorazione specifica, ma di tutti i tessuti.

I pezzi tolti dall'animale sono fissati per un quarto d'ora in una soluzione satura acquosa di picrato ammonico, il quale forma col blu di metilene una combinazione solubile in alcool; per renderla insolubile si adopera la miscela seguente: [molibdato ammonico g. 1, acqua distillata g. 20, acido cloridrico 1 goccia, e vi si lasciano per un'ora.

L'acqua ossigenata voluta dal BETHE non è necessaria, perchè il picrato d'ammoniaca ha già fissata la leucobase. Al molibdato si può

<sup>1)</sup> In *Anatom. Anzeiger*, 12. 1896, p. 438.

<sup>2)</sup> In *Arch. mikr. Anat.*, 46. 1895, p. 282.

<sup>3)</sup> In *Journ. de l'Anat. et Phys.*, 32<sup>a</sup> annata, p. 507 nota 2. 1896



sostituire il fosfomolibdato. [Il CAJAL (loc. cit.) aggiunge a 100 cc. di molibdato ammonico al 10 % 8-10 gocce di HCl e 5 g. di acido osmico al 10 %; e dopo lavato a lungo con acqua passa in questa miscela: formol 30 cc., acqua distillata 100 cc., cloruro di platino all'1 % 5 cc., e vi si lasciano le retine per 2-4 ore; poi disidratata rapidamente con alcool assoluto e passa in xilolo; quindi imparaffina, se occorre, o mette nella d'Ammar allo scoperto, se si deve lasciare la retina intera].

Si lava accuratamente per due ore; si passa negli alcoli, non lasciandovi i pezzi che il tempo necessario, una o due ore in tutto al massimo; poi xilolo, xilolo e paraffina, paraffina pura per mezz'ora, e si fanno sezioni di 20-30  $\mu$ .

Il metodo è sempre incerto. Infatti lo stesso BETHE mi assicura che col medesimo tessuto del medesimo animale ha avuto dei preparati che duravano cinque o sei anni inalterati, mentre altri erano sbiaditi dopo due o tre mesi.

### I METODI CITOLOGICI.

**346. Generalità.** — Per lo studio dell'intima struttura del sistema nervoso centrale i fissativi ed induritori usati per molti anni furono il bicromato potassico, il liquido del MÜLLER ed anche il bicromato d'ammoniaca. Ma se questi reagenti continuano ad essere sempre utili per certi metodi speciali, importanti nello studio della topografia, non sono certamente da consigliare nelle ricerche citologiche. Infatti i sali dell'acido cromatico producono una notevole retrazione dell'elemento nervoso e quindi la formazione del cosiddetto cortile della cellula (*Hofzelle*), e la struttura del citoplasma e del nucleo subisce delle alterazioni.

Un altro fissativo, al quale siamo debitori di molte delle nostre conoscenze sul sistema nervoso, è l'acido osmico, che al MAX SCHULTZE, al BELLONCI ed a tanti altri ricercatori diede modo di fare importanti scoperte; ma anche questo reagente non è privo di inconvenienti; gravissimo quello di rendere omogeneo il contenuto nucleare e quello citoplasmatico, sicchè non appare alcun particolare di struttura all'infuori delle fibre. Anche la pochissima penetrabilità dell'acido osmico ne ha sempre reso difficile l'uso; così che da solo non ha più alcuna applicazione nella citologia nervosa.

Neppure l'alcool assoluto è da consigliare come fissativo delicato; perchè è cagione di uno spostamento del nucleo, il quale viene portato dalla parte opposta a quella donde penetra l'alcool.

Rimangono, come fissativi precisi, il sublimato acquoso e quello acetico e alcoolico; il sublimato ed acido osmico e le due miscele

osmiche del FLEMMING e dell'HERMANN. Per tutte, e per le due ultime specialmente, si rammenti che i pezzi da fissare debbono essere di piccole dimensioni, non più grossi di due millimetri; in questo modo si sarà sicuri di una rapida penetrazione. Vedi del resto il § 231.

**347. Metodo Nissl, modificato.** — Si fissa nel sublimato acquoso saturo nell'acqua salata (0.75 ‰), per non meno di sei ore e fino a 24. Si lava con l'alcool jodo-jodurato, si disidrata, ecc. Le sezioni attaccate al vetrino non devono essere molto sottili (da 6 a 10  $\mu$ ) e si colorano con la tionina, nel modo già indicato (§ 82). La decolorazione con l'olio di anilina e alcool deve essere prolungata, e poi si lava con alcool assoluto finchè l'odore di anilina non si sente più, si rischiara con xilolo e si chiude nel balsamo.

Alla tionina si può sostituire il blu di toluidina.

Questo metodo serve specialmente per lo studio della sostanza cromatica del citoplasma (grumi o zolle del NISSL), ma siccome dà anche una buona colorazione nucleare può servire per lo studio di quest'ultimo. I preparati durano a lungo.

**348. Metodo di colorazione Biondi, ecc.**<sup>1)</sup> — Con le norme già date (§ 92) si fissa col sublimato e si colorano poi le sezioni. Nella fissazione è raccomandato di limitare il tempo a 1-3 ore, non di più, altrimenti il verde di metile non si combina stabilmente con la sostanza basofila. Si deve anche adoperare materiale fissato e preparato da poco tempo. Le sezioni non occorre siano molto sottili; la colorazione si fa con la soluzione allungatissima e per 20-24 ore. Non occorre lavare con acqua distillata e si toglie il liquido colorante in eccesso con carta bibula, poi si disidrata rapidamente, si rischiara con xilolo e si chiude in balsamo.

Questo metodo, al LEVI che se ne è servito a lungo, ha dato risultati importanti, sia per lo studio della costituzione del nucleolo, che per quello della mitosi delle piccole cellule della corteccia. I preparati non durano a lungo.

**349. Metodo dell'ematossilina.** — Invece dell'ematossilina DELA-FIELD, allungata con acqua, può servire benissimo, anzi con vantaggio, o l'emallume del MAYER (§ 72), o l'emateina IA dell'APÀTHY (§ 73). La fissazione si fa col sublimato, meglio se prolungata per 12-24 ore; le sezioni devono essere sottili, da 2 a 5  $\mu$ . Se la colorazione si fa con l'emallume la tinta va allungata con 20-40 volumi di acqua distillata e si lascia agire per una o due ore, non si lava con acqua e allume, ma con acqua distillata; si rischiara con

---

<sup>2)</sup> G. LEVI, *Ricerche sulla cellula nervosa dei vertebrati*, in *Rivista patologia nervosa*, ecc., v. 2. 1897.

xilolo e si chiude in balsamo e xilolo. Con l'emateina dell'APÀTHY si colora in mezz'ora e anche meno senza allungare la soluzione. Si hanno risultati più precisi ed una colorazione più delicata che non con l'ematosilina DELAFIELD.

**350. Metodi dell'Apàthy.** — Veramente questi dovrebbero venir descritti con quelli del sistema nervoso periferico, perchè hanno lo scopo di rivelare, con una differenziazione notevolissima, l'andamento, la struttura e il decorso delle fibre nervose. Ma appunto con i suoi metodi, che certamente porteranno una rivoluzione nel campo della citologia nervosa e che credo di non errare nel ritenere che sono destinati a succedere con incomparabile vantaggio a quelli della reazione nera e del blu di metilene, l'APÀTHY ha dimostrato che le fibre nervose non costituiscono la cellula ganglionare, ma vi penetrano per formare un reticolo endo-cellulare e peri-nucleare simile a quello che formano nella cellula sensoriale, e dopo attraversata la cellula proseguono per costituire la fibra motrice, di modo che quei metodi interessano egualmente lo studio dei centri nervosi e quello dei nervi periferici e delle terminazioni nervose sensoriali e motrici.

Invero, ho già detto (§ 107) che finora i metodi dell'APÀTHY hanno dato scarsa riuscita nei vertebrati e negli altri animali, all'infuori di quelli (Irudinei) ch'egli studia specialmente, e nei quali ha ottenuto così splendidi risultati. Ma pare insostenibile la tesi ch'essi siano limitati, e non di applicazione generale; e ritengo che chi si metterà di proposito a provarli negli altri gruppi animali vi riuscirà certamente. Quando si sono veduti i preparati dell'APÀTHY, le più delicate reazioni ottenute con i metodi neri e col blu di metile sembrano ben povera cosa; sia con l'emateina che col cloruro d'oro, l'APÀTHY è riuscito a darci una buona colorazione generale (violetta con l'emateina, rosso-porpora col cloruro d'oro) e una marcatissima differenziazione delle fibrille nervose e delle fibrille elementari, le quali appaiono d'un colore violetto intenso nelle preparazioni colorate con l'emateina, e nero di china nelle sezioni trattate col cloruro d'oro. E qui non abbiamo una reazione capricciosa che avviene in una sezione sì e in dieci no; qui, quando la differenziazione è ottenuta, possiamo seguire con l'esame delle sezioni successive in tutto l'organo, in tutto l'animale l'andamento delle fibre nervose.

Val bene dunque la pena di abbandonare i vecchi metodi tecnici del sistema nervoso, e di tentare il nuovo. La riuscita è difficile, ma il premio è degno della fatica: chi estenderà i metodi dell'APÀTHY ai vertebrati, potrà lasciare un nome durevole nella storia della citologia del sistema nervoso al principio del ventesimo secolo!

**351. Metodo del cloruro d'oro a fresco.** — Piccoli pezzi di tessuto

fresco sono tenuti all'oscuro in una soluzione all'1 % di cloruro d'oro *flavum* almeno per 2 ore e fino a 12, quindi sono direttamente trasportate in una soluzione d'acido formico all'1 % per 24 ore e di queste almeno 6-8 devono essere passate ininterrottamente alla luce. È necessario che la luce arrivi a tutte le parti del preparato, il quale dovrà essere sospeso nel liquido e questo tenuto in un recipiente isolato e che al disotto e dal lato opposto a quello da cui arriva la luce sia riparato con carta bianca, per avere riflessi i raggi luminosi.

Durante la riduzione bisogna lasciare il pezzo tranquillo. Dopo la prima ora si può, se la soluzione acida per la rapida riduzione che ha luogo dapprincipio è diventata oscura, cambiare il liquido ma con precauzione. Non è necessario lavare. Si può chiudere direttamente nella glicerina concentrata o nella gomma-sciropo di APÀTHY.

Anche pezzi non molto freschi o tenuti a macerare nell'alcool al terzo hanno dato una buona reazione.

**352. Metodo del cloruro d'oro per le sezioni.** — Fissazione di pezzi piccolissimi in sublimato acquoso con 0.5 % di cloruro sodico o in sublimato alcoolico (sublimato soluzione satura ed alcool assoluto a volumi eguali); interi animali o grossi pezzi, per 16-24 ore, membrane sottili per 4-5 ore nel sublimato alcoolico. Per i vertebrati ed anche per gli stessi irudinei meglio una miscela a parti eguali di acido osmico all'1 % e una soluzione satura di sublimato nell'acqua con 0.5 % di cloruro di sodio. Si mescolino le due soluzioni al momento di servirsene e si facciano, per quanto è possibile, all'oscuro tutte le operazioni successive fino all'imparaffinamento.

Si lava a lungo (per diverse ore e rinnovando la soluzione) con acqua jodo-jodurata (jodo 0,5 %, joduro potassico 1 %). Si trasporta per 10-15 ore nell'alcool a 95 % puro; quindi si toglie l'eccesso di sublimato che ancora fosse rimasto con alcool a 95 % contenente 0,5 % di J e 1 % di KJ, finchè il color giallo non scompare più. Si disidrata con alcool assoluto, da qui nel cloroformio (non nel xilolo), o nel cloroformio 4, etere 1, e si fa il rivestimento. Le sezioni, attaccate alla lastra con l'acqua distillata, si lavano con cloroformio, poi alcool assoluto e quindi si lasciano nell'acqua distillata per qualche ora, da 2 a 6. Quindi si passano in una soluzione acquosa di jodo (ottenuta col far bollire dei cristalli di jodo nell'acqua distillata e poi lasciando raffreddare), e vi si lasciano per 5 minuti. Così le sezioni diventano di color bruno, e si lavano nell'H<sup>2</sup>O finchè rimangono d'una tinta giallo-chiara. Si porta il vetrino con le sezioni in un tubo, come quelli figurati a pag. 112, contenente 1 % di cloruro d'oro *flavum* nell'acqua distillata e si lascia almeno tutta la notte, e fino a 24 ore, sempre all'oscuro. Si lava rapidamente con acqua distillata, oppure si cerca di levare l'eccesso della soluzione

d'oro aspirando con carta bibula, e si mette per 24 ore in un tubo con soluzione di acido formico 1 %, in modo che la lastra rimanga obliqua con le sezioni rivolte verso il basso, per evitare che il precipitato si deponga sopra di esse. Il tubo va tenuto alla luce diffusa, d'inverno anche al sole. Si lava con acqua e si chiude in balsamo, o in glicerina concentrata, o nella gomma-sciroppo.

Anche per le sezioni la riduzione deve aver luogo con una esposizione ininterrotta di 6-8 ore alla luce; e dalla parte del tubo opposta a quella da dove arriva la luce, come pure sotto di esso, si terrà della carta bianca.

Le sezioni possono essere fatte anche da pezzi in celloidina, perchè non devono essere molto sottili (da 7 a 10  $\mu$ ). È utile tanto per questa che per la paraffina di fare tutte le operazioni che precedono il rivestimento con celerità. Quando sono rivestiti i pezzi possono essere conservati a lungo: quelli in celloidina si coprono con un strato di gelatina glicerina alla quale si è aggiunto un poco di timolo. Occorrendo far le sezioni, si scalda leggermente, si lava la gelatina con acqua tiepida e si taglia tosto col coltello bagnato nell'alcool a 95 %.

Il trattamento col cloruro d'oro sulle sezioni è certamente il più importante dei metodi di APATHY, ed è quello che ha dato i risultati più splendidi e notevoli; ma è anche quello che presenta le maggiori difficoltà nella riuscita. L'espedito, trovato recentemente dall'autore (e da lui cortesemente comunicatomi), d'immergere le sezioni per 5 minuti nella soluzione acquosa di jodo, prima di trattarle col sale d'oro, facilita la reazione. La durata dell'immersione nel cloruro d'oro ed anche quella successiva nell'acido formico, come pure la forza delle due soluzioni, hanno poca importanza nella riuscita della colorazione specifica. Ne hanno invece moltissima la temperatura e la quantità di luce; così che, come si esprime l'autore, l'energia luminosa, quella termica e quella chimica dell'acqua acidulata devono dare tutte insieme una costante di energia, la quale se non è raggiunta esattamente impedisce anche che si raggiunga esattamente la reazione elettiva.

La temperatura più opportuna è di 20° C. Nell'estate la luce sarà anche troppo abbondante, ed allora fra la finestra ed il tubo con la soluzione acida s'interporrà uno schermo, fatto con un telaio sul quale è tesa della tela bianca. Nell'inverno invece il tubo sarà esposto all'azione diretta dei raggi solari, ma si dovrà lasciarlo scoperto, altrimenti l'acqua raggiungerebbe una temperatura troppo elevata.

**353. Metodo dell'emateina IA.** — Fissazione con sublimato, sublimato e acido osmico, sublimato e acido acetico, sublimato e alcool, miscela dello ZENKER (§ 52), acido acetico, acido picrosolforico ed i suoi derivati, *non mai bollenti*. I pezzi fissati possono.

essere conservati anche lungo tempo (due anni) nell'alcool forte. Perchè si tingano bene non devono essere più grossi di mezzo centimetro. Vanno lasciati almeno 48 ore, al più 72, nell'emateina IA, poi lavati con acqua distillata *assolutamente pura* e spesso rinnovata, per 24 ore.

Si passano direttamente nell'alcool assoluto, tenendoveli il tempo appena necessario, e s'imparaffinano col cloroformio o si rivestono in celloidina (mentre sono nel cloroformio o nella celloidina si devono lasciare all'oscuro). Le sezioni si chiudono o nella resina o nella glicerina pura neutra.

**354. Terminazioni nervose.** — I metodi stessi che abbiamo dato per il sistema nervoso centrale e periferico valgono anche per le terminazioni nervose. Quindi anche qui si adoperino: il cloruro d'oro, la reazione nera, il blu di metilene; ed anche qui primeggiano, per i risultati finora ottenuti, i metodi APÀTHY.

**355. Metodi embriologici per lo studio dello sviluppo del sistema nervoso.** — Esclusi assolutamente i metodi GOLGI e BETHE, bisogna ricorrere ad una buona fissazione col sublimato solo, con quello alcoolico e con quello alcoolico-acetico, o con la miscela dell'HERMANN, mettendo nel liquido fissatore l'intero embrione, se è molto piccolo, oppure facendolo in due o tre pezzi. Anche il CHIARUGI<sup>1)</sup> consiglia, per le ricerche citologiche del sistema nervoso negli embrioni, un fissativo energico, il liquido del FLEMMING, al quale mi pare che si possa sostituire con vantaggio quello dell'HERMANN. Con quest'ultimo si ottengono buone preparazioni colorando le sezioni con la saffranina, o con una doppia colorazione, come quella di fucsina e verde di metile del GALEOTTI. I pezzi fissati con sublimato verranno colorati *in toto* o sulle sezioni (che sarà meglio) con l'emalume o col carmallume, e con l'ematossilina ferrica. Anche coi colori di anilina (tionina, saffranina, violetto di genziana, ecc.) si hanno dei buoni preparati; ottimi, ma non duraturi, si avranno con la colorazione del BIONDI-HEIDENHAIN. Il CHIARUGI (l. c.), per grossi embrioni e per ricerche di morfologia, ha trovato vantaggioso, perchè molto penetrante, l'acido picrico.

Sarà sempre utile, disponendo di una certa quantità di materiale, di servirsi tanto del sublimato che della miscela di HERMANN. È importante provare anche i nuovi metodi APÀTHY.

**356. Studio della nevrogia.** — Un metodo speciale e che fu applicato con successo dal WEIGERT, nel 1895, allo studio della nevrogia umana, è il seguente:

<sup>1)</sup> CHIARUGI, *Il trigemello e gli occhi motori*, in Pubbl. Istit. Sup. di Firenze, 1898.

Piccoli pezzi di tessuto nervoso (non oltre il mezzo centimetro di spessore) sono induriti nella formalina al 10 % per pochi giorni (3-4) e quindi passati in una soluzione di acetato di rame neutro g. 5; acido acetico g. 5; allume cromico g. 2 e mezzo; acqua distillata 100 (si scioglie nell'acqua bollente l'allume cromico, si aggiungono poi l'acido acetico e l'acetato di rame). Vi restano per otto giorni alla temperatura ordinaria, e questo tempo può essere ridotto a metà col tenerli in una stufa a 30°-35° C. Si lavano con acqua, si disidratano e si rivestono in celloidina e si tagliano. Le sezioni vengono immerse per 10 minuti in una soluzione a  $\frac{1}{5}$  % di permanganato potassico e poi lavate accuratamente con acqua. Quindi si tengono per 3-4 ore in una soluzione di cromogeno 5 g., acido formico 5 g., acqua distillata 100 g.; si fa la soluzione, si filtra e si aggiunge un grammo di solfito sodico. Tolle da questa miscela si passano per 24 ore in una soluzione satura (circa il 5 %) di cromogeno.

Si lavano accuratamente e si colorano con una soluzione satura a caldo di metile violetto nell'alcool (a 70-80 %), alla quale, dopo raffreddata e decantata, sia stato aggiunto 5 % di acido ossalico. Le sezioni si lasciano nel colore per due ore, poi si scolorano con olio di anilina e xilolo; quindi xilolo puro e si chiudono in balsamo. Dopo due o tre mesi i preparati perdono la colorazione differenziale.

Come si vede, si tratta di un metodo molto lungo e complicato; ma esso è certamente di grande importanza, perchè permise al suo inventore di dimostrare l'esistenza delle fibre di nevroglia, che erroneamente venivano ritenute prolungamenti della cellula (astrocito).

### GLI ORGANI DEI SENSI.

**357. Generalità.** — Per lo studio dello sviluppo valgono i metodi embriologici (§ 355); e per quello delle terminazioni nervose tattili e di tutte le altre che vanno sotto questo nome servono i metodi già indicati per le terminazioni nervose, e che sono particolarmente esposti più sopra. Essi valgono anche per le ricerche delle cellule olfattive e di quelle gustative.

Quanto al materiale, per i corpuscoli tattili si dia la preferenza alla pelle del polpastrello del dito dei bambini; qui si avranno i corpuscoli del MEISSNER nella parte più superficiale del derma, subito sotto all'epidermide; i corpuscoli del GOLGI e MAZZONI e del RUFFINI, più profondamente, nel derma. Qui si trovano anche i corpuscoli del PACINI (o del VATER); ma per questi ultimi materiale migliore è il mesentere del gatto, nel quale sono così distinti da poter essere scorti ad occhio nudo.

Per le cellule olfattive si ricerchi la membrana giallastra (m. dello SCHNEIDER) nelle fossette olfattive dei giovani cani; e per le cellule gustative nelle grosse papille calciformi che formano il V linguale alla base della lingua dei cani stessi.

**358. Orecchio interno.** — Materiale opportuno: gatto neonato o coniglio di pochi giorni; si fora la capsula otica e poi si fissa nella soluzione del FLEMMING per 24-48 ore. Si lava accuratamente per alcune ore nell'acqua corrente, poi si passa negli alcoli, nell'alcool assoluto più etere, quindi nella celloidina al 2%. Dopo alcuni giorni nella celloidina al 4% e si completa l'incelloidinamento. Allora si passa nella miscela di floroglucina ed acido nitrico per 48 ore (§ 155) oppure nell'alcool 80% con 5% di acido nitrico per 3 giorni; si mette nell'alcool puro e poi s'imparaffina e si taglia. Si può anche decalcificare col cloruro di palladio leggermente acidulato (0.1%) con H Cl.

È utile anche scolorare le sezioni col metodo MAYER, prima di fare la colorazione. Questa può esser fatta nei più diversi modi. Una buona doppia colorazione la dà l'emallume e fucsina acida, oppure l'emallume e saffranina. Anche per l'orecchio valgono i metodi GOLGI e quelli al blu di metilene.

**359. Occhio.** — Di piccolo mammifero, di uccello, di anfibio. Deve essere preso sul vivo ed immerso nelle soluzioni osmiche, forando in uno o due punti poco interessanti la sclerotica e la corioide: in questo modo si fora anche la jaloidea, l'umor vitreo esce e lascia penetrare il fissativo. Si può anche infiggere uno spillo in un annesso dell'occhio e attaccare questo alla parte inferiore di un turacciolo, col quale si chiude un tubo nel cui fondo sta della soluzione di acido osmico 1%; così i vapori osmici fissano in pochi minuti (10-15); quindi si taglia l'occhio all'equatore, e si pone la parte posteriore per qualche ora a indurire nell'alcool, o in una soluzione di cloruro di platino. Volendo, si può scolorare prima di fare il rivestimento in paraffina. Si colora sulle sezioni.

Un progresso sensibile hanno fatto le nostre conoscenze sulla struttura della retina coi metodi del GOLGI e dell'EHRlich. Con l'impregnazione nera abbiamo l'importante lavoro del TARTUFERI (1887) e poi quello del RAMON Y CAJAL (1893). A quest'ultimo dobbiamo molti particolari tecnici che si trovano nella memoria citata ed in una più recente <sup>1)</sup> e dei quali vale la pena di dire qualche cosa.

Una delle difficoltà che presenta la retina per essere impregnata coi sali d'argento dipende dalla sua sottigliezza e grande superficie, che rende più che mai noiosi i depositi di sale d'argento. Per evi-

<sup>1)</sup> In *La Cellule*, 9. 1893, p. 126 e *Journ. Anat. Phys.* Paris, 32. 1896, p. 484.



tarli si procede nel modo seguente: aperto l'occhio e tolto l'umor vitreo si taglia la retina intorno alla papilla e poi, col mezzo di un pennello piccolo e delicato, oppure con la spatola di penna dell'APÀTHY (pag. 180), si stacca dalla coroide, ed allora si rotola la retina in modo che rimanga come un piccolo cilindro, o come una pallottola.

Se si tratta di un animale piccolo, con la retina delicata, bisognerà, dopo aperto l'occhio ed estratto l'umor vitreo, ripiegarla subito fino alla sua unione col nervo ottico, bagnando il pennellino con lo stesso umor vitreo; poi, servendosi della sclerotica, rivoltata all'indietro, come di un peduncolo per afferrarla, s'immerge la retina nella celloidina al 2 % per breve tempo, si lascia solidificare all'aria la pellicola e si taglia il nervo ottico, facendo cadere la retina dentro al recipiente contenente il fissativo, senza averla toccata.

Così la retina rimane unita come un tutto e può essere più facilmente sezionata.

La fissazione si fa nella solita soluzione osmio-bicromica per 1-3 giorni, poi si passa nel bagno d'argento e si ripete l'impregnazione. Per le successive manipolazioni vedi il capitolo precedente.

Il CAJAL (l. c., p. 507) s'è servito anche del blu di metilene, ma egli fa rilevare ripetutamente l'insufficienza di questo metodo, molto meno analitico del precedente, e che per la più scarsa impregnazione che dà ha indotto in errore anche osservatori esperti come il DOGIEL. Infine raccomanda anche l'uso dei soliti metodi per controllo.

**360. Macerazione.** — Per lo studio della struttura dei bastoncini e dei coni si usano i diversi metodi di macerazione già indicati al § 161.

**361. Preparazione dell'occhio in toto.** — Per conservare i rapporti reciproci delle diverse parti è opportuno mettere l'intero occhio nella formalina 2-4 % per qualche giorno e poi passare nell'acido cromico 1 %. Così si avranno i tessuti convenientemente induriti in modo che le diverse parti, anche nelle sezioni, conserveranno facilmente la loro posizione.

## CAPITOLO XXV

## Preparazione di animali inferiori per le ricerche istologiche.

**362. Protozoi.** — Vedi pag. 206.

**363. Preparazione di uova e di larve di diversi animali;** vedi il capitolo XXII: Embriologia dei metazoi.

**364. Preparazione di poriferi ed echinodermi.** — Si procede diversamente a seconda che si vogliono conservare o no i corpuscoli calcarei dello scheletro. Nel caso affermativo la fissazione dell'animale o del pezzo dovrà essere fatta nell'alcool forte, a 95 % o assoluto. Nel caso negativo si ricorrerà specialmente alle soluzioni osmiche e al sublimato acido, od anche al sublimato alcoolico acido. Per la completa decalcificazione vedi metodo ROUSSEAU (§ 154).

**365. Celenterati.** — *Meduse, Sifonofori e Ctenofori* potranno essere messi provvisoriamente nella formalina 2-4 %, che conserva bene la forma di questi animali delicati; i quali potranno poi (o *in toto* od anche i soli pezzi da studiare) essere fissati con i liquidi ripetutamente consigliati come i migliori.

Sezionare *in toto* questi animali con cavità amplissime e con pareti sottili e delicate è sempre cosa ardua.

Per i metodi speciali di preparazione di questi e di altri animali marini si ricorra all'importante lavoro del LO BIANCO<sup>1)</sup>, citato nella prefazione.

Per i polipi dei corallari e degli idroidi bisogna prima narcotizzare e dopo uccidere e fissare. Lo stesso dicasi per le *Attinie*. Alcune specie si fanno morire in estensione lasciandole nel recipiente, con acqua di mare, ermeticamente chiuso; quando l'ossigeno è consumato, l'animale muore disteso, con i tentacoli allungati. Allora si toglie dal liquido e lo si pone nel fissativo. Vedasi il citato lavoro del LO BIANCO.

**366. Echinodermi.** — L'asfissia naturale è anche qui un buon metodo, tanto per gli echini che per le oloturie. Del resto vedasi il LO BIANCO.

Per la decalcificazione vedi quanto è detto qui sopra (§ 364), e per la fissazione delle parti molli valgono i metodi generali.

**367 Vermi.** — I *Turbellari* si fissano generalmente allo stato di estensione lasciandoli in poca acqua e versando loro addosso, quando

<sup>1)</sup> In *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 9. 1890, p. 435.

sono bene distesi, una buona dose di soluzione satura acquosa di sublimato bollente. Poco dopo sarà bene fare in due o tre pezzi l'animale, secondo le dimensioni, e metterlo in una soluzione a freddo di sublimato alcoolico. Lasciandolo intero la penetrazione del fissativo è difficile a cagione della coagulazione e dell'indurimento avvenuto nel muco e nell'epidermide.

Credo questo metodo preferibile a tutti gli altri, anche i più recenti di VOIGT (1896), JAENICHEN (1897), ecc.

I *Cestodi* ed i *Trematodi* si fissano bene col sublimato acetico e col sublimato alcoolico acido.

*Nemertini*. — BÖHMIG <sup>1)</sup> fissa col sublimato solo o acetico, od anche con la miscela dello ZENKER o con quella del FLEMMING. Per averli in estensione e senza che venga vomitata la proboscide, bisogna prima addormentarli. LO BIANCO (*l. c.*, pag. 461) si serve dell'idrato di cloralio a 0,1 % nell'acqua salata, per 6-12 ore. Poi si fissano. BÜRGER (1895) tratta i grandi col metodo precedente, i piccoli fissa immediatamente col sublimato acetico bollente. Raccomanda l'imparaffinamento fatto con celerità, per evitare l'indurimento soverchio.

Anche MONTGOMERY <sup>2)</sup> dà la preferenza prima di tutto al sublimato acquoso, riscaldato a 40° C. per le forme piccole, alcoolico per le grandi; vengono in seguito le soluzioni osmiche e il liquido del PERÉNY. Sconsiglia l'alcool assoluto, l'acido cromico, il picrico e il picrosolforico.

*Nematodi*. — Anche qui il sublimato è il fissativo preferito. Per la dimostrazione della *Trichina* si prenda un pezzo di carne trichinata, si digerisca per 3 ore a 37° C. con pepsina acidulata con H Cl, così le trichine vive si mettono in libertà e possono essere osservate portandole sul microscopio da dissezione.

*Rotiferi*. — Anche questi devono essere addormentati con soluzioni allungate di cloridrato di cocaina e poi fissati. VOLK <sup>3)</sup> adopera 1-2 gocce di acqua ossigenata 3 % in 1 cc. di acqua; gli animali appena distesi si passano nel fissativo.

ROUSSELET, per avere gli animali in estensione, aggiunge all'acqua questa miscela, a goccia a goccia: idroclorato di cocaina al 2 % parti 3, alcool metilico 1, acqua distillata 6. Quando sono bene addormentati si fissano con soluzione osmica 1 a 1000.

*Gefirei*. — Si narcotizzano versando un poco di alcool forte alla superficie dell'acqua di mare nella quale si trovano, poi si fissano.

1) In *Zeit. wiss. Zool.*, 64. 1898, p. 484.

2) In *Zool. Jahrb. Abth. Morph.*, 10. 1897, p. 6.

3) In *Zool. Anzeiger*, 19. 1896, p. 294.

*Irudinei*<sup>1)</sup>. — Per averli in estensione si mettono nell'alcool debole (alcool a 90 parti 4, acqua parti 6); si sorveglia attentamente l'istante nel quale sono con i muscoli rilassati, tutti flosci (*Hirudo* dopo 8-10 minuti, *Pontobdella* dopo 3-4). Allora si prendono e si distendono sul fondo di una vaschetta, fermandoli ben distesi con delle punte di opuntia (fico d'India) e qui si uccidono col sublimato solo o col sublimato alcoolico.

Per la macerazione del sistema nervoso vedi pag. 130, e per la preparazione secondo i metodi di APÀTHY vedi § 350 e seguenti.

*Oligocheti*. — Una difficoltà che presenta il *Lombricus* ed altre forme è quella di avere l'apparato digerente tutto pieno di terra, la quale nelle sezioni, oltre rovinare i coltelli, sciupa la mucosa intestinale. Sono stati proposti vari metodi, come quello di tenere gli animali nella polvere di caffè, ma neanche questa materia è molto soffice e presenta l'inconveniente di restare più o meno aderente alle mucose. Ho trovato molto più semplice questo metodo: gli animali appena presi dal terreno sono narcotizzati, fatti in diversi pezzi, fissati e poi passati negli alcool; quando sono bene induriti, con un bisturi affilato conduco un taglio netto longitudinale e laterale, in modo da arrivare fino in cavità intestinale, quindi con uno spruzzatore lavo energicamente con acqua distillata tutto l'interno, e dopo rimetto nell'alcool, ravvicinando con la pressione moderata delle dita i due orli del taglio. Il pezzo riprende la sua forma cilindrica, nella quale s'era fissato e indurito e del resto nelle sezioni non è di nessun danno quel tratto interrotto che rimane in corrispondenza della ferita. Evito di fare il taglio sull'asse di simmetria, sia al dorso che al ventre, per non ledere organi importanti. Quanto al danno che può venire dai tagli laterali, esso sarà ridotto addirittura a zero, variando nei diversi pezzi la retta lungo la quale si fa il taglio, pur mantenendola laterale, col portarla un poco più in su o un poco più in basso.

Come fissativo raccomando il sublimato + acido picrico.

*Policheti*. — Si fanno morire in estensione versando poco alcool a 90 % alla superficie dell'acqua di mare nella quale si trovano; dopo alcune ore si fissano con sublimato acetico, oppure con sublimato alcoolico acido.

*Myzostoma*. — Si fissa in sublimato solo o acetico.

*Enteropneusti*. — Si addormentano con alcool e si fissano con sublimato solo o con sublimato + acido picrico.

**368. Sistema nervoso dei vermi.** — A quasi tutti i gruppi di questo tipo sono stati applicati i metodi dei vertebrati; e quindi l'impre-

<sup>1)</sup> Devo anche queste indicazioni alla cortesia del prof. APÀTHY.

gnazione nera, il blu di metilene, l'acido osmico, il cloruro d'oro. E appunto per dei vermi (irudinei) l'APÀTHY ha scoperto i suoi metodi speciali. Per i quali rimando al capitolo precedente.

Per i *Policheti* LEWIS MARGARET <sup>1)</sup> narcotizza prima gli animali col metodo di LO BIANCO: acqua di mare vol. 95, alcool a 96 % 5. Fra i fissativi uno dei migliori è quello di VOM RATH (acido picrossmioacetico con cloruro di platino), seguito da acido pirolegnoso (p. 31). Delle due soluzioni si preferisca quella che contiene meno acido osmico. Bisogna lasciare gli animali a lungo nell'alcool, prima di fare l'imparaffinamento, almeno parecchi giorni, meglio ancora per delle settimane. Per controllo si fissi con sublimato e si colori con ematossilina ferrica; ma il sublimato produce facilmente una deformazione, un raggrinzamento degli elementi.

Questi metodi, oltre che per lo studio del sistema nervoso centrale, erano usati anche per gli organi di senso periferici. In seguito veniva adoperato anche il blu di metilene nel modo seguente: i vermi erano prima narcotizzati e poi s'iniettava nella cavità del corpo, in due o più punti, una soluzione all'1,5 % di blu di metilene nella soluzione salina. Quindi si tornava a mettere l'animale nell'acqua di mare. Dopo pochi minuti l'iniezione era ripetuta ed il verme messo daccapo nell'acqua di mare. Dopo 5-6 ore gli organi di senso si coloravano, ed allora si procedeva secondo il metodo del BETHE (§ 345).

**369. Artropodi.** — Abbiamo già visto nell'embriologia che nella preparazione delle uova degli artropodi per avere una buona fissazione bisognava vincere la poca permeabilità del guscio. Questa difficoltà è molto maggiore negli animali, i quali sono rivestiti da una sostanza ancor meno permeabile, la chitina, spesso indurita dal deposito di sali calcarei. E per rammollire questa chitina furono consigliate diverse sostanze, specialmente l'acqua di JAVELLE e quella di LABARRAQUE: ma queste ed altre sono in generale e dai migliori osservatori ritenute come dannose ai tessuti interni, e quindi da evitare; eccetto quei casi nei quali non si può fare diversamente, e nei quali non si esiga una grande finezza di ricerche istologiche.

Un solo modo abbiamo per girare la difficoltà: prendere gli animali giovani, appena mutati, quando lo strato chitinoso è sottile e molle. Quanto ai fissativi è per gli artropodi specialmente che fu vantato l'acido picrosolforico, come quello che più facilmente penetra attraverso alla chitina. Ma quando lo si riconoscesse insufficiente, si ricorrerà al sublimato acetico, a quello alcoolico acido e alla miscela di sublimato ed acido picrico adoprata a caldo (70-80° C.) per pochi

<sup>1)</sup> In *Proceed. American Acad.*, 33. 1898, p. 225 e seg.

minuti, e dopo lasciata agire per delle ore a freddo. Quindi si passa direttamente nell'alcool. Qualche volta è utilissimo (e specialmente quando non si tratta di preparare tutto l'animale, ma solo qualche organo) d'introdurre con la cannula di una siringa <sup>1)</sup> il fissativo nell'interno del corpo, passando attraverso lo spazio fra un segmento addominale e l'altro. E in questo caso si potrà scegliere il fissativo che si reputa più atto; l'animale verrà poi immerso tutto nello stesso liquido col quale si è fatta l'iniezione.

Per piccoli e tenui crostacei come *Sapphirina*, o per giovani come *Phyllosoma*, si può fissare con miscele osmiche.

Il GIESBRECHT, che ha lavorato a lungo sui *Copepodi*, raccomanda come fissativo l'acido picro-acetico, con piccole quantità di acido osmico. Valgono quindi le miscele di VOM RATH, allungate con acqua. È difficile mantenere in estensione i *Copepodi* quando si vogliono fare dei preparati permanenti *in toto*, perchè tutti i liquidi rischiaranti e le resine producono delle contrazioni. Bisognerà dunque colorarli, se occorre, e dopo passarli dall'acqua nella gomma-sciroppo di APÀTHY o nella glicerina.

Per gli *Ostracodi* il MÜLLER (1894) adopra: alcool assoluto 1, etere solforico 5, e quindi passa nell'alcool a 70 %.

Per gli occhi di *Palinurus* il VIALLANES (1892) fissa nel sublimato con acido acetico 5 %, trasporta in alcool al 70 %, poi nella miscela a parti eguali di acqua, glicerina ed alcool assoluto <sup>2)</sup>. Qui leva il pigmento con il cloro (vedi § 157), quindi colora, ecc.

SCHÖNICHEN <sup>3)</sup>, per lo studio dell'intestino di *Porcellio* e di *Asellus*, fissa con sublimato o con acido picro-acetico. Questo lascia vedere più nettamente gli elementi. Per la colorazione adopera l'emallume ed il carminio boracico. Preferisce chiudere i preparati con olio di ricino, perchè, a cagione del basso indice di rifrazione, si scorgono più nettamente i dettagli istologici.

Per esapodi in generale si fissa a caldo: così il MÖBUSZ <sup>4)</sup> per lo studio dell'intestino di *Anthrenus* mette gli animali nell'acqua calda e poi fissa col sublimato alcoolico [meglio sarà fissare col sublimato acetico a caldo].

Per lo studio dello sviluppo post-embrionale di *Lasius flavus* il KARAWAIEW <sup>5)</sup> fissa le larve nell'acqua calda a 80° C. e poi a freddo

<sup>1)</sup> Se il fissativo intacca il metallo della cannula si adoperi la semplicissima siringa di vetro indicata a pag. 131.

<sup>2)</sup> Bene speso! vedi § 21.

<sup>3)</sup> In *Zeit. wiss. Zool.*, 65. 1898, p. 112.

<sup>4)</sup> In *Arch. Naturg.*, 63. 1898, p. 1.

<sup>5)</sup> In *Zeit. wiss. Zool.*, 64. 1898, p. 400.

nel liquido del KLEINENBERG o del FLEMMING, lasciandole intere se sono molto giovani, oppure facendo delle incisioni alla chitina sui fianchi, se sono più sviluppate. BRÜEL preferisce il fissativo del BOVERI (acido cromo-acetico).

Per gli *Acari* serve talvolta uccidere nei vapori di etere acetico <sup>1)</sup>. Il MICHAEL per lo studio della morfologia esterna raccomanda di uccidere gli animali buttando loro addosso acqua molto calda, quasi bollente; così muoiono istantaneamente e gli organi boccali e genitali rimangono estroflessi.

*Colorazione degli artropodi.* — In generale, specialmente se si tratta d'individui giovani e piccoli, gli artropodi fissati si possono colorare bene *in toto* con le soluzioni acquose: emallume e carmallume, oppure con quelle alcooliche: emacalcio e paracarminio. Ma talvolta queste tinte non penetrano ed allora si potrà servirsi della cocciniglia alluminosa, secondo il metodo del RABL (pag. 228).

**370. Sistema nervoso degli artropodi.** — Anche a questi sono stati già applicati i metodi in uso per i vertebrati, ed abbiamo parecchi lavori fatti col metodo del blu di metilene (RETZIUS sull'*Astacus*, BETHE sul *Carcinus*, ecc.) e dell'impregnazione nera (RETZIUS, KENYON). Il BETHE <sup>2)</sup>, con un suo metodo speciale, è riuscito a dimostrare nel *Carcinus* le fibrille elementari dell'APÀTHY.

Il KENYON <sup>3)</sup>, per lo studio del cervello dell'*Ape* col metodo GOLGI, ha avuto buone impregnazioni 15 volte su 100, sacrificando oltre a mille animali.

**371. Molluschi.** — Specialmente nelle due grandi classi dei gasteropodi e dei lamellibranchi, una difficoltà che s'incontra per la loro preparazione è la straordinaria contrattilità del corpo, che appena è eguagliata da quella di alcuni vermi. Occorre dunque, prima di tutto, cominciare dalla narcosi.

I *lamellibranchi* in generale si narcotizzano bene col metodo dell'alcool cioè col versare poco alcool forte sulla superficie dell'acqua nella quale vivono. Ma bisogna fare l'operazione con cautela, altrimenti se essi risentono subito l'azione dell'alcool rinchiudono ermeticamente le valve, e non si aprono più, se non quando sono per morire. Bisogna quindi lasciarli per qualche tempo tranquilli, isolati od in piccolo numero (2-3), in un cristallizzatore, e dopo versare adagio, lungo una parete del vaso, l'alcool, in modo ch'esso non si mescoli subito all'acqua; poi si ricopre il cristallizzatore con un vetro e si lascia stare per 12-24 ore. D'inverno occorrono due o più giorni

<sup>1)</sup> Comunicatomi dal prof. COGGI.

<sup>2)</sup> In *Arch. Mikr. Anat.*, 51. 1898, p. 385.

<sup>3)</sup> In *Journ. comp. Neurol.*, Cincinnati, 6. 1896, p. 133.

ma mettendo il cristallizzatore in un termostato a 25° C. si può abbreviare il tempo. La cocaina e il cloralio idrato possono sostituire l'alcool. Quando gli animali sono bene addormentati e con le valve aperte, si uccideranno rapidamente col liquido fissativo.

Tanto per le najadi che per i lamellibranchi marini credo che il sublimato alcoolico acido (§ 24) sia uno dei migliori fissativi; ma si può adoperare anche altri fissativi generali.

*Gasteropodi.* — Per i polmonati terrestri il vecchio metodo è quello di affogarli nell'acqua, che prima s'è fatta bollire per privarla dell'aria. Si riempie completamente un cristallizzatore, piuttosto grande e basso con acqua bollita fredda vi si mettono due o tre polmonati e si copre con una lastra piana. Dopo un certo tempo, secondo la stagione, gli animali muoiono asfissati in estensione, attaccati col piede alla lastra piana. Allora si staccano e si fissano con sublimato acetico, od alcoolico, per 3-8 ore ed anche più, se sono grandi.

Anche la soluzione 1 % di cloridrato d'idroxilammina, per 10-20 ore è stata adoperata per addormentare i polmonati. Bisogna lavare a lungo con acqua, perchè questa sostanza è un energico riduttore; è meglio adoperare poi per fissativo il solo alcool.

Per parecchi opistobranchi è raccomandato l'avvelenamento con la pelletterina; si fanno delle iniezioni con 1 cc. di soluzione 4 %. Il maggior numero dei prosobranchi si narcotizzano con l'alcool. Del resto occorre rammentare che vi è una grande differenza fra la sensibilità di una specie e quella di un'altra, anche vicinissima. Per maggiori particolari vedasi il lavoro del LO BIANCO, più volte citato.

*Cefalopodi.* — Questi possono essere addormentati tenendoli nell'acqua di mare con 2 per mille di cloralio idrato. Volendo una buona fissazione anatomica, cioè per lo studio macroscopico degli organi, si hanno risultati ottimi tenendo l'animale, anche se grossissimo, nella miscela di LO BIANCO (acido cromico 1 % con 5 % di acido acetico glaciale). La forma in questo modo si mantiene molto bene, e così pure i muscoli restano ben conservati; ma non tutti gli organi interni rimangono bene fissati, e quindi per scopi istologici conviene levare dall'animale vivente gli organi che si vogliono studiare e fissarli con i soliti fissativi generali.

*Studio macroscopico dei nervi dei molluschi.* — Gli esemplari, appena morti (di lamellibranco od anche di gasteropodo), si levano dal guscio e si mettono nell'acido acetico all'1 % per 6-7 giorni, cambiando il liquido ogni giorno. Per i nervi dell'apparato digerente dei polmonati il VILLANES pone il canale digerente per 24 ore in una miscela a parti eguali di aceto comune ed alcool a 90 %, poi per 24 ore nella trementina, infine lava ripetutamente nell'acqua lasciandovi il pezzo per 5-6 ore; poi fa la dissociazione. Mentre il tessuto muscolare è di colore grigio, i nervi appaiono bianchi lucenti, ed essendo



assai più resistenti si lasciano facilmente isolare. Per i cefalopodi si può servirsi dell'acido osmico, che si applica bagnando nella soluzione all'1 % delle strisce di carta bibula che si stendono lungo il decorso dei nervi.

**372. Sistema nervoso centrale e periferico.** — Valgono i metodi tante volte menzionati. L'impregnazione nera ripetuta (metodo CAJAL § 333 e metodo COX § 337) dà buonissimi risultati, e non soltanto nei polmonati (RETZIUS), ma anche negli altri gruppi; certamente non si riesce alla prima, anzi occorrono prove ripetute. Inferiore di molto rimane l'uso del blu di metilene. Per lo studio delle fibrille nervose delle cellule a ciglia vibratili nelle najadi vedi il lavoro recente dell'APÀTHY (1897).

Il *Cervello dei Cefalopodi* s'impregna molto bene col metodo del COX mantenendo i pezzi nel fissativo per 2-6 mesi, e poi ricorrendo all'incelloidinamento.

Per la citologia del sistema nervoso centrale dei molluschi occorre sempre materiale freschissimo, e quindi senza addormentare l'animale bisognerà afferrarlo e, con le forbici, tagliare rapidamente nella parte dorsale anteriore e mettere allo scoperto i gangli esofagei (subito dietro alla bocca). Bisogna avere l'animale ben stretto nella parte posteriore del corpo con la mano sinistra, e questo si farà afferrandolo quando è disteso. I gangli esofagei si mettono facilmente in evidenza perchè molto spesso sono colorati in giallo (polmonati e prosobranchi) o in giallo-rossastro (parecchi opistobranchi). Per mantenere bene i rapporti di posizione è comodo lasciare i gangli attorno all'esofago, e questo tagliare posteriormente, ma lasciandolo unito alla parte anteriore con la testa e mettendo tutto nel fissativo.

I cefalopodi si afferrano e rapidamente si taglia con una forbice o con un bisturi tutto il corpo dietro agli occhi, in modo che il cervello rimanga con gli occhi attaccato alla bocca e alle braccia. Se si facesse il taglio davanti agli occhi si avrebbe una brutta sorpresa: forti getti di nero verranno lanciati dall'animale e molto probabilmente colpiranno il preparatore. Dopo il primo taglio si stacca dalle braccia il pezzo che contiene lateralmente gli occhi e in mezzo il cervello. Quindi si levano i grossi occhi con la pelle, poi i corpi bianchi, e s'intacca con riguardo la cartilagine, che ripara i centri nervosi, come il cranio dei vertebrati l'encefalo. Messi allo scoperto, i gangli centrali possono essere posti nel fissativo. Quando l'animale è addormentato, sarà facile anche isolare ed esportare i due gangli stellari del mantello.

La fissazione dei gangli nervosi dei lamellibranchi non offre nessuna difficoltà, e valgono i soliti fissativi già raccomandati: il sublimato solo o acetico o alcoolico acido; le miscele del FLEMMINGE

dell'HERMANN; e quindi le colorazioni più adatte per quei fissativi.

Non così facile è la cosa per i cefalopodi; difficilissima per i gasteropodi; quando si voglia avere una buona fissazione, in modo che la forma delle cellule e della membrana nucleare e del nucleo resti bene conservata. Per i cefalopodi una difficoltà è data nei piccoli esemplari dalla cartilagine, che si leva a fatica; e nei grandi dalla robusta membrana fibrosa che ricopre il tessuto nervoso, e che è proprio a contatto con le cellule. Il sublimato e tutti i liquidi che lo contengono hanno la tendenza d'indurire la membrana; mentre le fissazioni con l'acido picrico ed anche con i bicromati permettono facilmente al coltello di tagliarla. Occorre procedere con una fissazione graduale non troppo energica, compiere rapidamente la disidratazione e l'imparaffinamento.

Peggio quando si ha da fare con i gasteropodi: qui le dimensioni rilevanti delle cellule, talvolta enormi (nella *Tethys* si vedono ad occhio nudo), il nucleo voluminoso, con contenuto molto fluido, l'abbondante tessuto gliare e connettivale che sta fra un elemento e l'altro, rendono molto difficile una buona fissazione e sono causa di alterazioni della forma cellulare e specialmente della membrana nucleare; alterazioni che erroneamente il MAC CLURE <sup>1)</sup> e qualche altro hanno attribuito all'azione di alcuni rischiaranti.

Sta in fatto che le fissazioni energiche danno dei risultati pessimi e che occorre un fissativo penetrante sì, ma che si sostituisca con una certa facilità ai liquidi cellulari; quindi buoni risultati danno le soluzioni al sublimato non molto concentrate e acquose e con poco acido acetico. Qui poi più che mai occorre fare una disidratazione rapida ed un più rapido imparaffinamento. La fissazione non sarà prolungata al di là delle 3-5 ore e si dovranno far succedere prima degli alcoli deboli, 50 %, resi poi gradatamente più concentrati. Buone colorazioni si avranno col metodo BIONDI-HEIDENHAIN, con quello dell'ematossilina ferrica dell'HEIDENHAIN stesso, col metodo del NISSEL, ecc.

Per lo studio dell'istogenesi del sistema nervoso centrale dei cefalopodi si prendano piccole *Sepia* appena schiuse e si fissino con sublimato alcoolico. Per sezioni trasversali si può lasciare l'animale intero, avendo cura di tagliar via il becco corneo; quando si è finito di sezionare la testa, non ancora si è arrivati al così detto osso. Volendo fare sezioni longitudinali, si potrà lasciare (per facilitare l'orientamento) una parte del corpo, oltre alla testa, e si taglierà via dalla superficie dorsale l'osso rimasto, prima di cominciare a fare le sezioni col microtomo.

<sup>1)</sup> In *Zool. Jahrb., Abth. Morph.*, 11. 1897, p. 16.

Nei giovani esemplari la cartilagine cerebrale si taglia facilmente.

*Sistema digerente di gasteropodi e di cefalopodi.* — In questi l'apparato si può isolare con facilità (cosa impossibile nei lamellibranchi), e fissare e trattare come un organo di un vertebrato.

Lo stesso dicasi per l'apparato riproduttore. E tanto per l'uno che per l'altro si capisce che si dovranno evitare i grossi esemplari. Nel fare le sezioni della prima parte dell'apparato digerente si rammenti che la radula (che pur si lascia tagliare) non servirà certo a rendere più sottile il filo del coltello!

*Conchiglia.* — Per lo studio di questa bisognerà servirsi di animali molto giovani, e ricorrere alla decalcificazione (§ 153).

*Branchie di Najadi.* — Si rammenti che qui nella parte più interna delle lamelle branchiali vi sono dei bastoncini calcarei, simili al guscio ed anche questi, pur lasciandosi tagliare, sciupano il filo del coltello.

Infine non si dimentichi, quando si fanno preparazioni *in toto* per poi sezionare tutto l'animale, che nell'interno dell'apparato digerente vi sono spesso dei gusci duri, silicei, ecc.

*Ciglia vibratili dei molluschi.* — Nelle sue notissime ricerche, l'ENGELMANN (1880) macerava l'intestino di *Anodonta* nella soluzione di bicromato potassico o nella soluzione salina al 10 % e in questi liquidi faceva la dissociazione. Oppure per un'ora nell'acido borico, salicilico od osmico (0.1 %). Ma di tutti questi metodi il più semplice, cioè la soluzione salina, è quello che dà migliori risultati. Aggiungo che con la fissazione nel sublimato alcoolico acido (CARAZZI) e poi con la colorazione in safranina, tanto dalle branchie che dall'intestino di *Unio* e di *Anodonta*, si hanno sezioni che dimostrano benissimo la struttura della cellula a ciglia vibratili.

*Pteropoda, Eteropoda.* — Prima di tutto devono essere addormentati con l'alcool o con la cocaina; talvolta l'operazione riesce difficilmente. Per maggiori particolari vedi il lavoro del LO BIANCO.

Per la conservazione provvisoria questi molluschi possono essere messi nella formalina al 4 %, ed essere fissati quando occorre. Oppure nella soluzione del LO BIANCO (acido cromico 1 % più 2.5 % di acido acetico glaciale). Una buona fissazione si può avere col sublimato secondo la formula del GILSON (§ 23).

**373. Briozoi e Brachiopodi.** — Prima si addormentano e poi si fissano. I secondi dovranno essere anche, dopo fissati, decalcificati.

**374. Tunicati.** — Per preparare gli animali vedi LO BIANCO. Per lo studio istologico delle *Salpe* il TODARO preferisce la fissazione col liquido cromo-acetico di LO BIANCO.

Le forme più piccole di *Salpa* si fissano bene anche con le miscele osmiche e col sublimato acetico.

**375. Anfiosso.** — Per lo studio istologico dei piccoli esemplari val-

gono i fissativi generali; ma si deve avvertire che il sublimato per la sua azione energica contrae rapidamente gli animali, che quasi sempre si curvano, e questo può essere un inconveniente molto grave per fare le sezioni. Occorre quindi adoprare non già il sublimato solo ma con le miscele del RABL (§ 26).

Per i cranioti vedi: embriologia dei vertebrati, organi e tessuti, metodi citologici.

---

## APPENDICE.

### Tecnica batteriologica e d'istologia patologica.

**376. Esame istologico d'un liquido.** — Se contiene in sospensione un gran numero di elementi solidi lo si potrà diluire con un poco di soluzione fisiologica (§ 140); se invece ne contiene un numero scarso, lo si centrifuga o lo si lascia sedimentare, dopo aver aggiunto (se si tratta di un liquido putrescibile e la stagione è calda) un poco di formolo o di cloroformio. L'esame si farà mettendo una goccia del liquido sul portaoggetti e ricoprendo col coprioggetti. Se si desidera colorare gli elementi in sospensione nel liquido si potrà aggiungere un poco di soluzione jodo-jodurata (§ 28) o, meglio, una soluzione di blu di metilene, fatta estemporaneamente, aggiungendo una goccia di soluzione alcoolica satura di blu di metilene in un vetro da orologio pieno di soluzione fisiologica. Talvolta servirà una soluzione acquosa 0,5 % di eosina.

In casi speciali occorre seccare e fissare sul vetrino gli elementi contenuti nel liquido, ed allora si procederà come è indicato al § 379.

**377. Esame batteriologico di un liquido: generalità.** — Per raccogliere piccoli campioni di liquido serve una pipetta di vetro affilata ai due estremi, che ciascuno può fabbricare da sè sulla lampada a gas o ad alcool. Le pipette si conservano con le estremità saldate alla lampada, dopo averle sterilizzate arroventandole. Quando si vuol servirsene si rompono le due punte, si aspira il liquido e si torna a saldare immediatamente gli estremi affilati. Il liquido così raccolto con l'asepsi più rigorosa, si potrà usare per le colture e per gli esami microscopici. In quest'ultimo caso, se l'esame non vien fatto al momento che si raccoglie il liquido, sarà bene aspirare nella pipetta anche un poco di cloroformio, che ucciderà i germi e ne impedirà la moltiplicazione, pur permettendo la colorazione di essi quando se ne faranno i preparati. Se si tratta di grande quantità di liquido, in cui si presuma che pochi siano i germi (orina,

alcuni essudati) si aggiungerà il cloroformio, si agiterà il liquido e si lascerà sedimentare in recipiente ben coperto, per procedere poi all'esame del sedimento.

**378. Esame diretto del liquido, senza sussidio di sostanze coloranti.** — Si pone una goccia sulla lastra e si copre col vetrino; si esamina a forte ingrandimento, con diaframma stretto. Si riconosceranno così facilmente le forme bacillari, filamentose, streptococciche, spirillari; le forme cocciche isolate od in ammassi potranno confondersi con granulazioni albuminose, che spariranno con l'aggiunta di acido acetico, o con granulazioni grasse, che spariranno con qualche goccia di soluzione 1-2 % di potassa caustica. Questi reattivi lasciano invece immutata la forma dei micrococchi. Importante è pure l'esame in goccia pendente, che si fa ponendo una goccia del liquido sul coprioggetti e capovolgendo questo (dopo averne spalmato l'orlo con vaselina) su di un portaoggetti incavato nel centro.

Si potrà così indagare se i germi contenuti nel liquido sono immobili. Si stia in guardia, per non confondere il movimento attivo dei germi col così detto movimento *browniano*, che si osserva nelle particelle solide sospese in un liquido. Uccidendo i germi col cloroformio o col sublimato (una traccia di soluzione acquosa satura è sufficiente) i movimenti attivi dei germi stessi cesseranno, mentre invece si vedrà continuarsi il movimento browniano.

La messa in foco della goccia pendente sarà agevolata col porvi attraverso un filo di cotone sul quale si dirigerà l'obbiettivo.

**379. Esame del liquido col concorso di sostanze coloranti.** — Per mezzo dell'ansa di platino si distende sul coprioggetti un sottile strato di liquido; l'ansa sarà stata preventivamente sterilizzata arroventandola sulla fiamma. Si asciuga il vetrino, movendolo rapidamente all'aria e si passa (con la faccia sporca in alto) tre volte attraverso la fiamma piuttosto lentamente, per coagulare le sostanze albuminoidi contenute nel corpo dei batteri e fissarli così nella loro forma. Si rovescia quindi il vetrino in una soluzione acquosa di un colore basico di anilina (p. 53), che si prepara estemporaneamente aggiungendo alcune gocce di una soluzione satura del colore in un vetro da orologio pieno di acqua distillata. Dopo aver colorato per 1-3 minuti si lava con acqua corrente e si esamina nell'acqua; oppure si asciuga con carta bibula, si secca al calore e si chiude nel balsamo. Invece di una soluzione acquosa di un colore basico, si potrà adoperare il liquido dell'EHRlich (§ 80) o quello del LOEFFLER: soluzione alcoolica satura di blu di metilene 30 cc., idrato potassico 0,1 % 100 cc. L'uno e l'altro sono di lunga durata.

Alcuni batteri difficilmente colorabili (*streptothrix*, bacillo della tubercolosi, ecc.) potranno impregnarsi del colore scaldando la soluzione, con dentro il vetrino, finchè cominciano a svolgersi i vapori.

Esaminando al microscopio il vetrino montato in acqua se ci si accorge che la tinta è troppo intensa basterà decolorarlo tenendolo per breve tempo in alcool 50 % o nell'acido acetico 0,5-1 %.

**380. Metodo Gram.** — Un grande valore diagnostico viene attribuito al metodo GRAM. Si colora il vetrino in una soluzione satura di violetto di genziana (o di fucsina, o di cristalvioletto) nell'acqua di anilina per 1-2 minuti, poi lo si passa nel liquido del LUGOL (§ 51) per 1-3 minuti, quindi nell'alcool assoluto finchè questo rimane scolorato. Si chiude il preparato nel balsamo.

Con questo metodo alcune specie batteriche rimangono colorate, altre no. Quelle che rimangono colorate si dicono appunto « colorabili col metodo del GRAM » o, più brevemente, « resistenti al GRAM ». Tutti gli altri elementi della preparazione si scolorano, e conviene quindi (per facilitare la messa in foco del preparato e per scorgere i rapporti fra i microbi e gli elementi cellulari) fare una colorazione di contrasto con una soluzione acquosa od alcoolica di eosina 0,5 %.

Diamo qui l'elenco dei principali microrganismi, secondo il loro modo di comportarsi rispetto al metodo GRAM.

| Si colorano col metodo Gram                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Non si colorano col metodo Gram                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stafilococco aureo.<br>»    albo.<br>»    citreo.<br>Micrococco tetragono.<br>Streptococco piogeno.<br>Diplococco pneumonico.<br>Sarcina polmonare.<br>»    lutea.<br>»    aurantiaca.<br>Bacillo dell'acido lattico.<br>»    piociano.<br>»    murisettico.<br>»    dell'erisipela dei suini.<br>»    megaterio.<br>»    della lebbra.<br>»    sottile.<br>»    del carbonchio.<br>»    butirrico.<br>»    mesenterico.<br>»    del tetano.<br>»    della difterite.<br>»    della tubercolosi.<br>Actinomicete albo.<br>»    aurantiaco.<br>»    luteo-roseo.<br>»    sulfureo, ecc.<br>Spirillo rosso.<br>concentrico.<br>Leptothrix epidermidis. | Micrococco della blenorragia (o gonococco).<br>Bacillo del tifo.<br>»    della peste.<br>»    del colon.<br>»    della setticemia emorragica.<br>»    della morva.<br>»    del colera dei polli.<br>»    dell'edema maligno.<br>»    del carbonchio sintomatico.<br>»    fluorescente.<br>»    prodigioso.<br>Streptobacillo dell'ulcere molle.<br>Pneumobacillo di Friedländer.<br>Vibrione colerigeno.<br>»    albense.<br>»    acquatile.<br>»    danubico.<br>»    di Berlino. |

*METODI SPECIALI.*

**381. Bacilli tubercolari.** — Se si tratta di un essudato o di mio-sina sarà bene lasciar sedimentare per 24 ore almeno, dopo aggiunta di cloroformio, in un recipiente conico coperto; meglio ancora sarà centrifugare a lungo il liquido sospetto e procedere all'esame del sedimento.

Se si tratta di uno sputo si preparerà un vetrino stemperandovi sopra con l'ansa di platino un poco di mucosità presa dai grumi più gialli. Seccato e fissato alla fiamma (§ 379) si capovolge il vetrino su di un vetro da orologio o una capsula di porcellana contenente della soluzione di ZIEHL (fucsina basica g. 1, alcool assoluto 10 cc., H<sup>2</sup>O 100 cc., acido fenico 5 g.). Si tritura la fucsina in un mortaio e si scioglie con l'alcool assoluto, poi si aggiunge a poco a poco l'acqua fenicata. La colorazione si farà a freddo per 5 minuti, o al calore per un minuto, evitando di far bollire il liquido. Si lava il vetrino con acqua comune e lo si capovolge, tenendovelo per un minuto, in un altro vetro da orologio contenente della soluzione di GABBET (blu di metilene 2 g., acido solforico 25 % 100 cc.).

Si lava accuratamente con acqua, si asciuga con carta bibula e si secca al calore (si eviti di avvicinarsi alla fiamma col vetrino) si chiude in balsamo e si esamina a forte ingrandimento.

Dopo colorato con la fucsina si può anche fare la scolorazione con acido nitrico o solforico al 25 %, quindi lavare con acqua e poi con alcool; far successivamente la colorazione con la soluzione acquosa di blu di metilene, ecc.

I bacilli tubercolari sono colorati in rosso; tutti gli altri microrganismi e i rimanenti elementi in blu.

Se nel primo vetrino non si trovano bacilli tubercolari sarà bene fare almeno altre 3-4 preparazioni con altre parti dello sputo. Si può anche dissociare lo sputo ponendolo in una grossa provetta piena per due terzi di alcool debole (30 %), si scuote fortemente e a lungo, si lascia sedimentare per 24-48 ore in un luogo caldo. Per facilitare l'azione dissociante dell'alcool si può aggiungere 1 % di idrato potassico; dopo si neutralizza con acido acetico 10 % e si lascia sedimentare.

Nel sedimento si ricercano i bacilli, facendo dei preparati col metodo già indicato.

**382. Bacilli della lebbra.** — Si incide la parte sospetta e si prepara un vetrino, nel solito modo, con una goccia di sangue; si fa la stessa colorazione che per i bacilli tubercolari. I bacilli della lebbra differiscono da quelli della tubercolosi: perchè sono più corti,

perchè si trovano di solito in numero abbastanza rilevante, perchè si colorano più facilmente, mentre resistono molto di più alla decolorazione con gli acidi.

**383. Actinomyces.** — Giova distinguere l'actinomicosi classica dalle forme atipiche. Nel primo caso il pus ed i prodotti di disfacimento dei tessuti invasi dal fungo mostrano dei granuli giallastri, talora bianchicci o verdastri o brunicci o chiazzati. Schiacciando qualcuno di questi granuli, fra il vetrino e la lastra, ed esaminando senza nessuna colorazione si vedranno nettamente le clave disposte intorno alla parte centrale, filamentosa del cespuglio. Volendo colorare i cespugli bisogna prima sbarazzarli dalla sostanza organica che li circonda, lavandoli rapidamente con idrato potassico 30 %, poi in acqua distillata; si porranno poscia in contatto per 5-10 minuti con una goccia di picrocarminio; la parte centrale del granulo si colorerà in giallo uniforme, le clave periferiche in orange.

Se si tratta della forma filamentosa dell'actinomicosi (infezione da *cladothrix*, *streptothrix*, ecc., degli autori), si avranno colorazioni eleganti con la fucsina fenicata di ZIEHL (§ 381), col liquido dell'EHRlich (§ 80) o col metodo GRAM (§ 380), seguito da una colorazione di contrasto.

**384. Bacillo difterico.** — Si coloreranno i vetrini, preparati nel solito modo, per 1-3 minuti nel blu di metilene di LOEFFLER (§ 379), nel violetto di genziana di EHRlich o di NICOLLE. Quest'ultima soluzione si prepara sciogliendo nel mortaio 1 g. di violetto di genziana in 10 cc. di alcool assoluto e aggiungendo a poco a poco 100 cc. di acqua fenicata al 2 %. Il violetto di genziana può essere sostituito dal cristalvioletto (ROUX). Si potrà colorare anche col metodo GRAM, con l'avvertenza di non prolungare troppo la decolorazione con l'alcool assoluto.

**385. Cocchi piogeni.** — Con una scarsa quantità di pus si prepara il vetrino nel solito modo e lo si colora con liquido dell'EHRlich o con quello di ZIEHL, allungati con acqua. Si farà anche una preparazione col metodo GRAM, perchè la maggior parte dei cocchi piogeni si colora con questo metodo (*stafilococco*, *streptococco*, *diplococco*). Il gonococco non si colora col GRAM, e si userà il liquido EHRlich o LOEFFLER molto diluito. Una doppia colorazione del gonococco si può fare colorando prima col liquido EHRlich, lavando con acqua, colorando per mezzo minuto con una soluzione acquosa di eosina 1 %.

**386. Bacillo del carbonchio.** — Si estrae con l'ansa del sangue dalla pustola sospetta e si prepara un vetrino. Si colora con uno qualunque dei metodi descritti, quello di GRAM compreso. Per vedere la capsula conviene colorare col violetto di metile acquoso al 2 % riscaldato leggermente, poi lavare rapidamente (2 secondi) con



acqua, quindi per 6-10 secondi in acido acetico 2 % poi con acqua. Si esamina nell'acqua, e se la colorazione è riuscita si secca e si chiude in balsamo.

**387. Bacillo del tetano.** — Si prepara il vetrino col pus della ferita in cui si è stabilita l'infezione tetanica e si colora con uno dei soliti metodi, compreso quello di GRAM. Per la colorazione delle spore vedi più avanti (§ 399).

**388. Bacillo della morva.** — Si prepara il vetrino col pus sospetto. Si colora col liquido LOEFFLER o con quello EHRLICH, al quale si aggiunge 0,01 % di idrato potassico. Si lava rapidamente con acido acetico 1 % che si è colorato in giallo-vino aggiungendo della soluzione acquosa di tropeolina 00; si lava in acqua e poi si chiude. Col GRAM non si colora.

**389. Strepto-bacillo dell'ulcera molle.** — Si prepara un vetrino con un poco di essudato dell'ulcera; si colora con uno dei soliti metodi. Non resiste al GRAM.

**390. Bacillo dell'influenza.** — Si prepara il vetrino con un poco di escreto. Si colora per alcuni minuti con la fucsina fenicata, ma molto diluita. Non resiste al GRAM.

**391. Bacillo del tifo.** — Lo si ricercherà, se si crede opportuno, nel sangue della milza, estratto con una puntura esplorativa; oppure nella polpa splenica del cadavere. Colorazione solita, di preferenza con la fucsina a caldo. Non si colora col metodo GRAM.

**392. Vibrione colerico.** — I vetrini si preparano con le feci, o col velo sottile biancastro che si forma dopo 24 ore alla superficie di un bicchiere (anche non sterilizzato) in cui si siano poste un poco di feci colerose e poco più di una soluzione di peptone 1 % e cloruro sodico 0,5 %. Si colora per 8-10 minuti con fucsina acquosa. Non resiste al GRAM.

**393. Bacillo del rinoscleroma.** — Con un poco di muco nasale si prepari il vetrino. Solita colorazione. Resiste al GRAM, e così si distingue dal similissimo pneumo-bacillo del FRIEDLAENDER.

**394. Bacillo dell'ozena.** — Si prepara e si colora come il precedente. Col GRAM si scolora, rendendo così ancora più facile la confusione col pneumo-bacillo, al quale molto somiglia.

**395. Bacillo dell'edema maligno.** — Si prepara il vetrino col liquido estratto per incisione dalla regione edematosa. Solita colorazione. Si distingue dal bacillo del carbonchio perchè non resiste al GRAM.

**396. Pneumo-bacillo del Friedlaender.** — Si colora con le solite soluzioni acquose di anilina. Al GRAM non resiste. Per la colorazione delle capsule vedi qui sotto.

**397. Bacillo della peste.** — Si prepara il vetrino col succo delle glandule linfatiche tumefatte e nei casi di setticemia col sangue. Si colora con i soliti metodi, non col GRAM.

**398. Colorazione delle capsule.** — Uno dei metodi migliori è quello del FRIEDLAENDER. Il vetrino preparato nel solito modo s'immerge per 1-3 minuti nell'acido acetico 1 %, si asciuga soffiando sul vetrino con un tubo di vetro e poi agitando rapidamente all'aria; si colora per alcuni secondi col liquido dell'EHRlich; si lava con acqua, si asciuga con carta bibula, si secca e si chiude in balsamo.

**399. Colorazione delle spore.** — Volendo colorare solo le spore si passerà il vetrino per 20-30 volte sopra la fiamma, oppure lo si scalderà fino a 200° C. nella stufa da disinfezione, poi lo si colorerà con una soluzione acquosa di blu di metilene. Per effetto dell'elevata temperatura, i nuclei ed i batteri perdono la facoltà di colorarsi, mentre le spore si tingono più facilmente.

Se, oltre alle spore, si vuole colorare anche il corpo batterico si seguirà il metodo di MÜLLER: il vetrino, tenuto 2 minuti in clorofornio, si passa per pochi secondi nell'acqua, poi da mezzo minuto a 2 minuti (secondo la specie microbica) in una soluzione di acido cromico 5 %. Si lava accuratamente con acqua e si colora per 1 minuto, a caldo, con fucsina di ZIEHL; si passa per 5 secondi nell'acido solforico 5 % e si torna a lavare con acqua; si colora per mezzo minuto con la soluzione acquosa di blu di metilene; si lava e si chiude.

**400. Colorazione delle ciglia.** — Si può fare solamente sulle specie microbiche ottenute da coltura. Si prenda una coltura giovane (12-24 ore) su agar, se ne asporti un poco con l'ansa e si stemperi con acqua distillata in modo da averla molto diluita. Una goccia di questo liquido si distende su di un vetrino pulitissimo e si prepara nella solita maniera. Si colora a caldo, finchè si producono vapori, e si lascia ancora per 1-2 minuti, con la seguente miscela, del LOEFFLER: 10 cc. di una soluzione 25 % di acido tannico, 5 cc. di una soluzione acquosa satura a freddo di solfato ferroso, 1 cc. di soluzione acquosa od alcoolica di fucsina. Se si tratta di microbi acidificanti (b. tifico, b. coli, b. del carbonchio sintomatico, b. subtilis, vibrione settico, micrococcus agilis) sarà bene aggiungere qualche goccia di una soluzione 1 % d'idrato sodico. Se si tratta di microbi che rendono alcalino il mezzo nutritivo (vibrione colerico, v. di FINKER e PRIOR, v. di METSCHNIKOFF, b. piociano, ecc.), si aggiungerà invece delle gocce di acido solforico 1 %.

Si lava bene con acqua, ripulendo accuratamente anche i margini per levare ogni traccia del mordente, poi si lava con alcool assoluto e si colora a caldo, fino a produzione dei vapori, con una soluzione satura di fucsina in acqua di anilina, alla quale sia stata aggiunta a gocce della soluzione 1 % di idrato sodico, finchè il liquido dà segno d'intorbidamento. Si lava in acqua e si chiude.

Molto più spiccio è il metodo di BOWHILL. Si colora, riscaldando leggermente, per 10-15 minuti in una soluzione acquosa satura di orceina (maturata da 10 giorni almeno) 15 cc., soluzione acquosa di tannino al 20 % 10 cc., acqua distillata 30 cc. La miscela dev'essere filtrata. Si lava e si esamina nell'acqua. Se la colorazione non è sufficiente si rimette il vetrino nella miscela. Le ciglia si vedono meglio conservando il preparato con acqua, invece di chiudere nel balsamo.

### ESAME DEI TESSUTI.

**401. Esame istologico.** — Per l'esame isto-patologico dei tessuti valgono i metodi che si usano per i tessuti normali. Dei fissativi indicati nel capitolo II si preferirà l'alcool assoluto, quando il tessuto non è molto fresco e quando si debba poi fare anche la ricerca dei microrganismi. Il sublimato e il liquido del FLEMMING si preferiranno nelle ricerche di alterazioni cellulari. Buoni servizi renderà talvolta il liquido dello ZENKER e del FOÀ (specialmente quando sarà adoperato con iniezioni per le vie sanguigne e dopo anche per immersione). Quando si debba fare un esame sollecito si potrà prendere per fissativo la formalina in soluzione 4-10 % od anche servirsi del congelamento.

Quando i pezzi contengono delle produzioni ossee e calcaree bisognerà decalcificare, con uno dei metodi indicati nel capitolo XIII.

Il rivestimento si farà in paraffina quando occorrono sezioni molto sottili, altrimenti si userà la celloidina.

Le colorazioni sarà sempre meglio farle sulle sezioni, per giovare dei vari metodi che servono per distinguere le diverse specie di microrganismi.

Per colorare le granulazioni protoplasmatiche e certi speciali corpi fucsino-fili valgono questi due metodi, dei quali non è stato fatto parola nel capitolo XXIII.

**402. Metodo Altmann.** — Piccoli pezzi freschissimi, si fissano per 24 ore nel bicromato potassico 5 % e acido cromatico 2 % a parti eguali. Si lava per 24 ore in acqua corrente. Le sezioni si colorano a caldo, finchè si producono vapori, in una soluzione al 20 % di fucsina acida nell'acqua di anilina. Si lascia raffreddare e si passa in una miscela di acido picrico, soluzione alcoolica satura, parti 1, acqua parti 2; si rinnova la soluzione una volta, lasciandovi le sezioni da mezzo ad un minuto a 50° C. Si lava con alcool e si chiude in balsamo.

**403. Metodo Russel.** — Si fissa in alcool o in MÜLLER, si colorano le sezioni per 10-15 minuti in una soluzione di fucsina basica

fenicata; si lava per qualche minuto con acqua e per mezzo minuto nell'alcool assoluto. Si colora per 5 minuti in una soluzione 1 % di verde jodo nell'acqua fenicata (2 %); si disidrata rapidamente e si chiude in balsamo.

**404. Degenerazione mucosa.** — Frequente nelle cellule epiteliali delle mucose e delle glandole, nei cistomi ovarici, nei carcinomi gelatinosi.

Si fissano i pezzi in MÜLLER, in sublimato o in formalina. Per la colorazione si preferiscano i colori basici di anilina; del resto si veda § 301, esame del muco.

**405. Degenerazione colloide.** — Stessa fissazione; colorazione con l'emallume del MAYER.

**406. Degenerazione ialina.** — Valgono gli stessi metodi.

**407. Degenerazione amiloide.** — Doppia colorazione con emallume ed eosina. L'amiloide si colora in rosa.

Se i pezzi sono consistenti, come spesso succede nella degenerazione amiloide, si potranno fare le sezioni a fresco per saggiarle con la reazione del jodo. Si prepara questa miscela: liquido del LUGOL parti 10, acqua distillata 10, glicerina 5; vi si tengono le sezioni per 1-3 minuti e si esaminano in glicerina. Le parti che hanno subito la degenerazione amiloide mostreranno un colore rosso mogano, il rimanente del tessuto rimarrà giallo smorto.

**408. Ricerca del glicogeno.** — Si trova nelle cellule epatiche, nelle anse dell'HENLE dei diabetici, nonchè in alcuni tumori (encondromi, rabdomiomi, ecc.). Il glicogeno è solubile nell'acqua, perciò si fisseranno i pezzi nell'alcool assoluto. Si colora col liquido del LUGOL: il glicogeno si tingerà in rosso-vino.

**409. Tessuti connettivi, sangue.** — Vedi i diversi metodi già descritti nei capitoli XXI e XXIII.

**410. Granulazioni eosinofile del sangue.** — Merita di essere ricordato il metodo INGHILLERI, che ha il vantaggio di colorare anche i microbi del sangue.

Fissazione in alcool assoluto ed etere (§ 237), poi per 30 minuti in cloroformio; si colora a caldo per 2-3 minuti in una soluzione 1 % di eosina in alcool a 70 % parti 4 e soluzione acquosa saturata di blu di metilene parti 6. Si lava, si disidrata rapidamente e si chiude in balsamo.

Le granulazioni eosinofile, i globuli rossi, il citoplasma dei leucociti restano colorati in varie gradazioni di rosa, i nuclei dei leucociti, le granulazioni basofile, i microrganismi in blu.

**411. Granulazioni neutrofile.** — Si prepara la seguente miscela, dovuta all'EHRlich: soluzione acquosa saturata di fucsina acida 5 volumi, idem di blu di metilene 1 volume, H<sup>2</sup>O 5 volumi; si lascia riposare qualche giorno e si filtra. Con questa soluzione si colora per 5 minuti, poi si lava in acqua.

I globuli rossi restano colorati in rosso, le granulazioni dei leucociti in violetto.

**412. Granulazioni basofile.** — Comprendono le granulazioni  $\delta$  e  $\gamma$  di EHRlich, che si colorano con le soluzioni basiche di anilina. Le granulazioni  $\gamma$  sono più grosse e son dette anche granulazioni delle *Mastzellen*. Per colorare le une e le altre serve il metodo INGhILLERI (§ 410). Si può anche seguire il metodo EHRlich colorando per 5-10 ore in questa miscela: alcool a 75 % cc. 150, acido acetico glaciale 12,5, Dahlia a saturazione. Si lava rapidamente in acqua e a lungo nell'alcool.

**413. Reazione dei globuli rossi.** — Nel sangue normale sono acidofili; volendo studiare le modificazioni che avvengono in certi stadii patologici si ricorrerà alla colorazione doppia con emallume ed eosina, o a quella di MARAGLIANO e CASTELLINO con l'orange e il blu di metilene. Le parti alterate delle emazie assumeranno un colore blu e quelle sane una tinta rosso mattone, con l'eosina, e giallo a ancio con l'orange.

**414. Esame del sangue negli organi, ricerca delle piastrine.** — Vedi §§ 241 e 243.

**415. Esame batteriologico del sangue.** — Non differisce, nella tecnica, da quello di un altro liquido qualunque; rimando perciò al già detto. Volendo facilitare la colorazione dei microrganismi si metteranno i vetrini, prima di colorarli, in acido acetico 1-5 % per qualche secondo; poi si laverà accuratamente con acqua, per facilitare la estrazione della emoglobina. I microrganismi che possono trovarsi nel sangue umano sono il bacillo del carbonchio, lo spirillo della febbre ricorrente, lo streptococco, lo stafilococco aureo e albo, il diplococco, il bacillo della peste bubbonica. Più di raro il bacillo del tifo, il b. coli, quello della tubercolosi.

Le colorazioni si faranno con soluzioni acquose di aniline basiche, si esperimenterà anche il metodo GRAM. Ottimi risultati si avranno dal metodo dell'INGhILLERI (§ 410).

**416. Ematozoari della malaria.** — Si preleva il sangue da un polpastrello di un dito o dalla milza, al principio dell'accesso o poco prima. Si esamina a fresco, senza l'aggiunta di nessun reattivo e possibilmente col sussidio del tavolino riscaldabile (§ 189).

Volendo colorare i parassiti col metodo di PLEHN si preparerà il vetrino, nel solito modo, con un sottil strato di sangue che si fisserà per 2 ore col metodo del NIKIFOROW (alcool assoluto ed etere solforico a parti eguali). Si colora per 5-6 minuti col blu di metilene, soluzione acquosa satura parti 60, soluzione di eosina a 0,5 % in alcool a 75 parti 20, acqua distillata parti 20, soluzione d'idrato potassico al 20 %, gocce 12. Si lava in acqua, si asciuga con carta bibula e si chiude in balsamo. I nuclei dei leucociti blu scuro, gli ematozoari

blu chiaro, i globuli rossi e le granulazioni eosinofile dei leucociti rossi. Eccellenti risultati si hanno anche dal metodo INGHILLERI. Meglio di tutti, secondo il KOCH <sup>1)</sup>, è il metodo ROMANOWSKY.

Quest'ultimo metodo fu di recente modificato dal LAVERAN <sup>2)</sup>. Per avere una soluzione di forte potere colorante bisogna fare una speciale preparazione del blu di metilene, seguendo le indicazioni del dott. BORREL, dell'istituto Pasteur. Una soluzione di nitrato d'argento si tratta con una soluzione di soda, si raccoglie e si lava accuratamente l'ossido d'argento precipitato. Questo è poi mescolato con una soluzione concentrata di blu di metilene. Si agita, si lascia a contatto per qualche giorno; allora si depone del cloruro d'argento, mentre la base del blu di metilene è messa in libertà. Si decanta, ed il liquido colorante così ottenuto è chiamato dal LAVERAN: blu di Borrel.

Per colorare gli ematozoari si prende: blu di Borrel 1 cc., soluzione acquosa 1 a 1000 di eosina 5 cc., H<sup>2</sup>O 4 cc. Le due soluzioni coloranti vanno filtrate al momento di mescolarle.

Il sangue è disseccato sul vetrino e fissato per un'ora nell'alcool assoluto; quindi il vetrino è colorato per 12-24 ore, poi si lava con acqua distillata e si passa per 1-2 minuti nella soluzione acquosa al 5 % di tannino.

I nuclei degli ematozoari si colorano in violetto più o meno cupo, il protoplasma resta incolore o si tinge in blu; le emazie prendono una tinta rosea, e i nuclei (quando si tratta di globuli nucleati) si colorano in violetto.

**417. Vasi sanguigni, cuore.** — Per la degenerazione grassa e la degenerazione torbida della fibra cardiaca ci si servirà con molto vantaggio di sezioni fatte dal pezzo congelato, od anche di fine dissociazioni.

L'indurimento del miocardio si farà lasciando i pezzi poco tempo nell'alcool e rivestendo con celloidina. Per l'esame della fibra muscolare si può colorare con emallume e fucsina, od anche con le soluzioni dell'acido carminico. Per le ricerche dei microrganismi si userà il blu di metilene di LOEFFLER, la tionina di NICOLLE o il metodo GRAM, previa colorazione con carmallume o cocciniglia.

Una buona fissazione dei vasi si ha col liquido dello ZENKER. Buone colorazioni delle arterie si hanno col metodo UNNA-TAENZER (§ 297). Se le pareti arteriose sono calcificate si fisseranno con un liquido decalcificante, oppure si tratteranno, dopo fissate, con l'acido nitrico e la floroglucina (§ 155).

<sup>1)</sup> *Deutsche mediz. Wochenschr.*, n. 5 del 1899.

<sup>2)</sup> *Comptes rendus de la Soc. de biol.*, 10. 6. 1899, p. 250.

**418. Esame della milza.** — Si possono preparare i vetrini con succo splenico per la ricerca dei microrganismi, seguendo uno dei metodi generali indicati.

Per lo studio del tessuto si faranno sezioni da materiale fissato con sublimato, liquido FLEMMING, ZENKER, FOÀ. La colorazione si può fare con i soliti metodi, od anche ricorrendo al metodo di VAN GIESON: indurimento in alcool o in liquido del MÜLLER; colorazione delle sezioni per mezz'ora o un'ora nell'emallume, si lava a lungo con acqua, si colora con una soluzione rosso-granato oscuro ottenuta aggiungendo, a goccia a goccia, una soluzione acquosa satura di fucsina acida ad una di acido picrico. Un rapido passaggio nell'acqua e poi si lava in alcool 1-5 minuti e si chiude in balsamo.

Se la milza è ripiena di globuli rossi sarà meglio fare il rivestimento con la celloidina.

**419. Midollo osseo.** — I preparati sui vetrini si fanno con i soliti metodi. Per le sezioni si apre un osso per lungo e si fissa il midollo col liquido FLEMMING, di ZENKER o di FOÀ. Per le colorazioni valgono i metodi indicati per il sangue.

**420. Ghiandole linfatiche.** — Si fissa col sublimato, col liquido dello ZENKER o di FOÀ. Solite colorazioni. Per la ricerca dei microrganismi e della fibrina vedi metodi speciali.

**421. Cute; mucose.** — Si fissa in sublimato o nel liquido dello ZENKER. Non occorrendo sezioni molto sottili si faccia il rivestimento in celloidina.

Per le fibre elastiche vedi § 297. Serve anche il metodo WEIGERT per la fibrina; con questo le fibre elastiche di colore rosso lucente si distinguono dalle connettivali tinte in violetto.

Per la cheratojalina si fissa in alcool, si colora con emallume, si scolora per 10 secondi con permanganato potassico 0,4 per mille, od anche con ferricianuro potassico (giallo) al 10 % per 20 minuti. Si lava in acqua distillata e si passa in alcool. I nuclei si scolorano tutti, mentre restano colorati i granuli dello strato granuloso. La cheratojalina spicca con colore violetto oscuro sul protoplasma rosastro.

Per distinguere la eleidina dalla cheratojalina DREYSEL e OPPLER consigliano questo metodo: fissazione per non più di 2-3 giorni, nell'alcool assoluto, rivestimento in celloidina. Colorazione con: carminio 1, ammoniaca 1, soluzione acquosa satura di acido picrico 1, H<sup>2</sup>O g. 100; prima di servirsi della soluzione si lascia evaporare a bagno maria la maggior parte dell'ammoniaca e poi si filtra. Le sezioni si colorano per non più di un minuto, se si vuol mettere in evidenza la sola eleidina, e per 5-6 minuti se si vuol colorare anche la cheratojalina. Si lava, si disidrata e si chiude in balsamo.

Per il collogeno si userà il metodo UNNA.

Indurimento in alcool, colorazione delle sezioni per 20 secondi in una soluzione acquosa 1 % di *Wasserblau*, si lava in acqua; si colora per 5 minuti in una soluzione acquosa neutra di saffranina, si lava, si disidrata, si chiude.

Per le mucose infiammate si farà la ricerca dei batteri e della fibrina con i relativi metodi speciali.

**422. Tubo gastro-enterico.** — Valgono i metodi dell'istologia normale, capitolo XXIII.

**421. Glandole salivari, fegato, pancreas.** — Per la ricerca dei microrganismi nel tessuto infiammato si fissa con alcool o con sublimato. Questo secondo si preferisca sempre per il fegato, perchè conserva il pigmento biliare. Per la degenerazione grassa vedi metodo DADDI (pag. 237).

Per le flogosi dell'interstizio con neoformazioni connettivali si adotti il metodo di VAN GIESON o quello di WEIGERT, modificato da BENECKE, per la fibrina.

Per la dimostrazione dei canaliculi biliari il BÖHM consiglia il metodo rapido del GOLGI (vedi cap. XXIV).

**424. Reni.** — Si fissano in sublimato, liquido ZENKER, FOÀ. Si preferisca la fissazione in alcool assoluto quando si vuole coagulare l'albumina eventualmente esistente nelle capsule di BOWMANN e nei canaliculi. Per il rene itterico meglio fissare con sublimato. Per le colorazioni valgono i soliti metodi; nel rene cirrotico si preferisca quello di VAN GIESON, che tingerà contemporaneamente la sostanza amiloide e quella jalina.

**425. Organi genitali.** — L'ovaia si fissi in sublimato o in liquido ZENKER; così pure la placenta ed il testicolo. Trattandosi di frammenti di tumore uterino estratto dal chirurgo, si cerchi di fare le sezioni perpendicolarmente alla superficie della mucosa dell'utero.

**426. Organi di senso. Tessuto muscolare, cartilagineo ed osseo.** — Valgono i metodi dell'istologia normale.

**427. Apparato respiratorio.** — La trachea e i bronchi contenenti pseudomembrane difteriche saranno fissate in alcool o in formalina, colorate col carmallume e poi con il metodo WEIGERT; si vedranno i nuclei rossi, la fibrina e i bacilli difterici violetti. Anche i polmoni saranno fissati in alcool per lo studio della fibrina e dei microrganismi. In sublimato per la degenerazione grassa col metodo DADDI. In liquido del MÜLLER o di ZENKER per mettere in evidenza i globuli rossi nei capillari delle pareti alveolari. Per impedire il raggrinzamento del tessuto polmonare conviene, prima ancora di aprire il torace, far scorrere il liquido fissatore per la trachea, in modo che penetri negli alveoli e ne scacci l'aria. Le colorazioni si faranno con carmallume o cocciniglia, facendo poi seguire il metodo WEIGERT o



GRAM; nel caso che si tratti di microrganismi non colorabili col GRAM si useranno i metodi LOEFFLER o NICOLLE.

**428. Sistema nervoso.** — Valgono i metodi dell'istologia normale (capitolo XXIV). Il metodo NISSL si adopera specialmente per lo studio delle alterazioni (*cromatolisi*) della cellula gangliare. Il metodo del GOLGI è il più adatto per lo studio delle alterazioni dei prolungamenti delle cellule. Il metodo del WEIGERT per le fibre midollate. Una buona colorazione dei cilindrassi si avrà col metodo di VAN GIESEN (§ 418), che tinge in rosso bruno i cilindrassi, in giallo la guaina mielinica, in rosso-blu i nuclei, in rosso la nevroglia, in rosso lucente le zone sclerotiche. Il metodo riesce meglio con pezzi fissati in liquido del MÜLLER; ma può servire anche l'alcool o la formalina.

Per la nevroglia si adopera il metodo WEIGERT od anche quello di VAN GIESEN.

Per le fibre degenerate vedi il metodo MARCHI.

### RICERCA DEI MICRORGANISMI NEI TESSUTI.

**429. Generalità.** — I pezzi dovranno essere fissati in sublimato, in alcool assoluto o in formalina. Per la colorazione se si tratta di organismi resistenti al GRAM si può adoperare il metodo WEIGERT per la fibrina. Oppure si colora con carmallume o cocciniglia, poi con il violetto di genziana dell'EHRlich per 2-10 minuti. Si passa nel liquido di LUGOL per un minuto; quindi in alcool assoluto finchè non si scioglie più colore e si chiude in balsamo.

Se si tratta di microrganismi che non resistono al GRAM si userà il metodo LOEFFLER o di NICOLLE. Oppure si colorano a lungo (5-24 ore) le sezioni con una soluzione acquosa al 2 % di violetto di genziana, si lava e si disidrata in alcool assoluto fin che rimane un colore violetto chiaro. I batteri saranno di una tinta più cupa dei nuclei. PFEIFFER colora le sezioni di pezzi induriti in alcool per mezz'ora o un'ora in fucsina fenicata allungata con 20 volumi di H<sup>2</sup>O. Lava con acido acetico 1 % finchè la tinta vira al grigio violetto, disidrata e chiude. I batteri sono di un rosso cupo, i nuclei rosso pallido.

**430. Bacilli della tubercolosi.** — I pezzi si fissano in alcool assoluto, le sezioni si colorano col metodo ZIEHL a freddo o tutto al più ad un calore moderato. Oppure si colora per 10-20 minuti col violetto di EHRlich, si scolora per un minuto in acido nitrico 20 %, si lava in alcool 70 % finchè la sezione non cede più colore. Si fa

una colorazione di contrasto con una soluzione acquosa 30 % di bruno di BISMARCK <sup>1)</sup>, si lava in acqua, si disidrata, ecc.

Un buon metodo è anche quello di KÜHNE. Si colora con emalume, si lava accuratamente con acqua, si colora a freddo per 15 minuti con fucsina di ZIEHL; si scolora nel cloridrato di anilina al 2 per mille per mezzo minuto al più. Si disidrata, ecc.

**431. Actinomyces.** — La forma filamentosa si colora col metodo WEIGERT per la fibrina, dopo colorato il tessuto col carminio o con la cocciniglia.

La forma clavata si colora per 24 ore in safranina alcoolica, si lava accuratamente con acqua; si colora con emalume e si lava per alcune ore con acqua. Si torna a colorare per 1-3 ore nel violetto di EHRLICH, si passa per 5 secondi in una soluzione 0,60 % di Na Cl; si asciuga con carta bibula satinata, si tiene per 1-2 minuti nel liquido LUGOL, si torna ad asciugare e si scolora in olio di anilina 2, xilolo 1, finchè la sezione non cede più colore. Si fa una colorazione in olio di anilina saturo di eosina per 15-30 minuti; si passa in xilolo e si chiude. Il micelio si colora in violetto, le clave in rosso-blu, i nuclei in violetto, il protoplasma e le emazie in rosso.

**432. Bacillo della morva.** — Col metodo di NONIEWICZ si colora per 2-5 minuti in liquido LOEFFLER, si lava in acqua, si scolora per 1-5 secondi con acido acetico 0,5 % volumi 75, soluzione acquosa di tropeolina 00 al 0,5 % volumi 25. Si lava in acqua, si asciuga, si disidrata, ecc. I bacilli spiccano per la tinta blu scuro sul tessuto colore azzurro chiaro.

**433. Parassiti del cancro.** — SANFELICE (1895) si serve di questi due metodi per la ricerca dei blastomiceti del cancro.

Un primo metodo, che dà colorazioni molto belle, è il seguente: si colorano *in toto* con litio-carminio dei piccoli pezzi di tessuto, e, dopo averli trattati successivamente con alcool acido e con alcool assoluto, s'imparaffinano. Le sezioni si attaccano con albumina sul portaoggetti e, dopo averle liberate dalla paraffina con xilolo, si trattano con alcool assoluto e con liquido di EHRLICH per 5-10 minuti. Tolto il liquido di EHRLICH e lavate le sezioni con acqua distillata, vi si aggiungono poche gocce di una soluzione di acido ossalico al 0.5 %. L'acido ossalico fissa il colore nelle forme parassitarie, di modo che dopo aver tolto l'acido ossalico con l'acqua distillata, lavate le sezioni sino a che non si sollevano più nuvole di colore, con l'alcool assoluto, tenute per qualche tempo in xilolo e montate in balsamo, le forme parassitarie colorate in violetto spiccano molto bene sul fondo rosso del tessuto.

<sup>1)</sup> Si scioglie a caldo, si lascia raffreddare e si filtra.

Un altro metodo di colorazione, che dà anche buoni risultati, è il seguente: si colorano le sezioni, dopo averle attaccate sul portaoggetti con albumina, in un miscuglio a parti eguali di safranina in soluzione acquosa all'1 % e di verde di malachite in soluzione idro-alcoolica all'1 %. Dopo 10-20 minuti le sezioni così colorate si lavano con acqua distillata e si pongono nella soluzione di acido ossalico a 0.5 %, nella quale si tengono 2-3 minuti. Si lavano poi in alcool assoluto, finchè non si sollevano più nuvole di colore, si trattano con xilolo e si montano in balsamo.

Con questo metodo le forme parassitarie si colorano in verde e gli elementi del tessuto in rosso.

**434. Esame dei muscoli trichinati.** — Si cerchi di preferenza le parti di muscolo vicino al tendine nei muscoli masticatori e nel diaframma. Di solito basta l'esame a fresco delle fibre dilacerate nella glicerina. Se le capsule sono calcificate si fa agire sul muscolo una soluzione 3-5 % di H Cl. Volendo fare sezioni si fissa in sublimato o col liquido ZENKER, si riveste in celloidina, si colora con emallume e eosina.

Vedi anche pag. 271.

---



## AGGIUNTE E CORREZIONI

---

1. — A pag. 39, § 56, la formula del primo liquido fissativo è realmente del LO BIANCO; non lo è la seconda, con quantità doppia di acido acetico. È anche questa da consigliare, perchè dà sovente ottimi risultati.
2. — A pag. 68, linea 30, è detto erroneamente che lo xilolo ed il benzolo sono più leggeri dell'alcool assoluto. Dovevo dire invece che sono un poco più pesanti, come risulta dalla tabella a pag. 190, § 228.
3. — A pag. 88, dico che il portaoggetti sistema THOMA-JUNG si potrebbe applicare al microtomo BECKER. Avrei dovuto aggiungere che la modificazione è già stata attuata nei più recenti modelli del BECKER, come si scorge dalla fig. 12 a pag. 92, nella quale il microtomo BECKER è provvisto appunto di un portaoggetti sistema THOMA-JUNG.
4. — A pag. 98, in fine, ricordo l'inconveniente dovuto alle superficie secondarie di affilamento, quando si vogliono fare sezioni sottili. Ma non ho descritto il reggi-coltello di APÀTHY, che dovrebbe appunto rimediare a tale inconveniente. Questa omissione è volontaria; infatti il reggi-coltello è stato recentissimamente modificato e migliorato molto. Rimando quindi il lettore alla descrizione che ne sarà fatta dai signori MAYER e SCHOEBEL nel prossimo fascicolo del XVI volume della *Zeit. wiss. Mikr.*
5. — Un nuovo e semplice apparecchio per orientare gli embrioni in paraffina quando sono molto piccoli verrà descritto del signor JORDAN in uno dei prossimi fascicoli del XVI volume della *Zeitschrift* suddetta.
6. — Per l'esame di uova viventi merita di essere menzionato l'apparecchio costituito essenzialmente da un tubettino sottilissimo di vetro, una descrizione del quale si può leggere nel lavoro del CHABRY (*Journal Anat. Phys.*, Paris, 23. 1887, pag. 168). Un sottile ago di vetro penetra nel bulbo capillare e può essere adoperato per produrre la puntura di un blastomero. Con molte modificazioni, dovute al dottor KOPSCH, l'apparecchio, di facile uso e di costruzione precisa, si potrà avere da MAGEN, Optiker, Scharnhorstr., 34 A, Berlin, N. W. Il costo è di 50 marchi. Tubi capillari ed aghi di vetro si fanno facilmente da sè.
7. — A pag. 209, nota, ad *Arch. zool. expérim.* aggiungi: 2.<sup>me</sup> s., vol. VII, 1889.



# INDICE ALFABETICO

---

## A

- Abbe (apparato) da illuminazione, 153, 157.  
 » (camera chiara), 9.  
 (teoria del microscopio composto), 161.
- Acari (preparazione degli), 275.
- Acido acetico glaciale, 35.  
 » cromico come fissativo, 24.  
 » cromico come induritore, 40.  
 osmico (soluzioni di), 33.  
 » osmico e cloruro d'oro, 65.  
 osmico come fissativo, 24, 32.  
 osmico e pirogallico, 65.  
 » picrico come fissativo, 24, 31.  
 picro-nitrico del Mayer, 39.  
 picro-solforico, 32.
- Acqua di anilina, 188.  
 » blu, 56.  
 » distillata, 184.  
 distillata per attaccar le sezioni, 107.  
 » salata, 116.
- Actinomyces, 284.  
 » nei tessuti (ricerca dell'), 294.
- Adenoide (tessuto), 237.
- Affila-rasoio, 82.
- Agassiz e Whitman (embrioni di Teleostei), 223.
- Aghi, 179.
- Albumina glicerinata del Mayer, 109.
- Alcool, 184.
- Alcool (graduazione dell'), 185.
- Alcool anidro, 186.  
 » assoluto, 186.  
 » come induritore, 23, 40.
- Alcoolometro di Gay Lussac, 176.
- Altmann (metodo) per l'esame istologico dei tessuti, 287.
- Anestesia di animali, 131.
- Anfibi (uova degli) fissazione delle, 224.
- Anfiosso (preparazione dell'), 279.  
 (uova di), 223.
- Anfipodi (uova degli) fissazione delle, 216.
- Anguis (embriologia dell'), 225.
- Anilina (acqua di), 188.  
 » (colori di), 50.
- Aniline blu, 56.
- Animali (anestesia di), 131.  
 (preparazione di), 131.  
 inferiori (preparazione di) per le ricerche istologiche, 270.
- Anodonta (embriologia dell'), 221.
- Anthrenus (intestino di), 274.
- Apáthy (ansa di platino di) per raccogliere piccoli oggetti, 127.  
 » (differenziamento del tessuto muscolare dal connettivo), 238.  
 (emateina I A dell'), 48.  
 (embriologia degli irudinei), 214.  
 (gomma-sciroppo dell'), 119.  
 (indicazioni sui preparati), 147.  
 » (liquido dell') per la macerazione, 130.  
 (metodi al cloruro d'oro per le fibrille del sistema nervoso dell'), 263, 264, 265.  
 » (metodo dell') per tenere attaccate le sezioni delicate, 114.  
 (metodo dell') per attaccare le sezioni in celloidina, 110, 111.  
 (orientazione di oggetti difficili), 137.  
 (reggi-coltello dell'), 85, 99.  
 » (rivestimento con celloidina a secco), 74.  
 (spatole dell'), 180.  
 (triplice colorazione dell'), 238.
- Apertura numerica, 160.
- Apparato Abbe da illuminazione, 153, 157.  
 » respiratorio, 292.
- Appendice, 280.
- Aracnidi (uova di) fissazione delle, 217.
- Argento (nitrato d'), 63.
- Arcia (uova di), 215.

Arnold (metodo di) per la preparazione del sangue, 200.  
 Artropodi (colorazione degli), 275.  
 (embriologia degli), 216, 218.  
 (preparazione degli), 273.  
 " (sistema nervoso degli) preparazione del, 275.  
 Ascaris (uova di), 212, 213.  
 Aseoli (sangue della lampreda), 203.  
 Asellus (preparazione dell'), 274.  
 Astaeus (embriologia dell'), 217.  
 Aurelia (sviluppo dell'), 211.

## B

Bacillo tubereolare, 283, 293, 294.  
 del carbonchio, 284, 285.  
 difterico, 284.  
 » dell'edema maligno, 285.  
 dell'influenza, 285.  
 della lebbra, 283.  
 della morva, 285, 294.  
 dell'ozena, 285.  
 della peste, 285.  
 del rinoscleroma, 285.  
 » del tetano, 285.  
 del tifo, 285.  
 Bagnomaria, 179.  
 Ballowitz (organi elettrici), 239.  
 (macerazione degli spermatozoi), 204.  
 Balsamo del Canada, 120.  
 Barattoli, 180.  
 Basofile (granulazioni) del sangue, 288, 289.  
 Bastoni di vetro, 183.  
 Batoidei (embriologia dei), 223.  
 Batteriologica (tecnica), 280.  
 Becker (microtomo), 91, 92, 93, 94.  
 » (portaoggetti del microtomo), 297.  
 Bell (cemento del), 120.  
 Benzolo e xilolo, 297.  
 Bengtsson (sviluppo della Phalaerocera), 218.  
 Bergonzini (cellule plasmatiche e mastzellen), 236.  
 Bernhard (tavoletta di), 11.  
 Bethe (fibrille nervose), 65.  
 (metodo del blu di metilene), 260.  
 Bicchieri a calice, 184.  
 Biedermann (terminazioni nervose negli insetti), 239.  
 Bilancia, 176.  
 Biondi (metodo di colorazione), 57, 262.  
 Bistori, 179.  
 Bitume di Gindea, 119.  
 Bizzozzero (metodo di) per la dissecazione del sangue, 201.  
 (metodo di) per la preparazione delle piastrine, 203.  
 Blastomiceti, vedi Parassiti del canero.  
 Blu di metilene, 54.  
 di metilene (metodi al) per il sistema nervoso, 259.  
 di metilene di Gabbet, 283.  
 » di metilene di Loeffler, 281.  
 Böhm e Oppel (embriologia dell'Auguis e della Lacerta), 225.

Böhmig (preparazione dei nemertini), 271.  
 Born (metodo di) per l'orientamento degli oggetti, 137.  
 Borrel (blu di metilene di), 290.  
 Bowhill (colorazione delle ciglia dei batteri), 287.  
 Bottiglie, 180.  
 Bottigliette con contagocce, 181.  
 Boveri (fissativo del), 38.  
 Braem (sviluppo dei briozoi), 216.  
 Branchie di najadi (preparazione delle), 279.  
 Brauer (sviluppo degli scorpionidi), 217.  
 Braus (studio del fegato), 233.  
 Briozoi, 216, 279.  
 Bruciatore Bunsen, 177.  
 Brücke (lente), 18, 170.  
 Briël (sviluppo degli insetti), 218.  
 Brun (liquido del), 118.  
 Bunsen (bruciatore), 177.  
 Bürger (preparazione dei nemertini), 271.

## C

Cajal (indicazioni sul metodo rapido di Golgi), 248, 249, 250.  
 (metodo del blu di metilene), 261.  
 (processo della doppia impregnazione), 251.  
 (regole per l'uso del metodo rapido), 251, 252, 253.  
 (terminazioni nervose negli insetti), 239.  
 Calberla (liquido del), 117.  
 Calkins (nucleo di protozoi), 209.  
 Cambridge-Jung (microtomo a bilico), 99, 100, 101, 102, 103.  
 Camera chiara (disegni fatti con la) ingrandimenti dati dai, 13.  
 Camera chiara Abbe, 9, 10, 11.  
 » chiara per la dissezione, 167.  
 » chiara di Oberhäuser, 9.  
 umida, 183.  
 Campanelle, 183.  
 Canero (parassiti del), 294-295.  
 Capitella (sviluppo della), 215.  
 Capsule (colorazione delle), 286.  
 Carazzi (ricerca del ferro nei tessuti), 196.  
 (ingrandimento dei disegni microscopici), 14.  
 Carbonchio (bacillo del), 284.  
 Carmallume, 45.  
 » e indaco-carminio, 61.  
 Carminio (colori del), 42, 44.  
 alluminico, 45.  
 boracico, 45.  
 Carnoy e Lebrun (embriologia degli anfibii), 225.  
 » (fissativo di), 35.  
 (preparazione di uova di Ascaris megaloccephala, 212, 213).  
 Carta bibula, 184.  
 da filtro, 184.  
 Cartilagine, 235.  
 Cartilagine jalina, 236.  
 Cartilagineo (tessuto), 292.  
 Caryophyllia (sviluppo della), 211.



- Cassettine da dissezione, 179.  
 Castellino, vedi Maragliano.  
 Cauciù del Müller, 120.  
 Cefalopodi (cervello dei) preparazione del, 277.  
 » (preparazione dei), 276.  
 » (uova dei) fissazione delle 221.  
 Celenterati (embriologia dei), 211.  
 (preparazione dei), 270.  
 Celloidina (per attaccare le sezioni in), 110.  
 (rivestimento con la), 71, 72, 73.  
 Cellula (esame a fresco della), 193.  
 (fissazione della), 193.  
 (studio della) materiale di ricerca per lo, 196.  
 Cellulare (colorazione), 196.  
 » (fissazione) metodi per una buona, 194.  
 Cellule (esame a fresco di), 129.  
 (ferro nelle) ricerca del, 196.  
 muscolari lisce, 237.  
 » plasmatiche, 236.  
 Cemento del Bell, 120.  
 Centrosoma (colorazione del), 196.  
 » (fissazione del), 194.  
 Cerebratulus (nova di), 212.  
 Cestodi (uova di), 211.  
 » (preparazione dei), 271.  
 Chabry (tubo di vetro di) per l'esame delle uova, 297.  
 Chiarugi (sviluppo del sistema nervoso), 266.  
 Chiusura dei preparati, 122.  
 permanente dei preparati (sostanze liquide per la), 118.  
 Ciclostomi (nova di) fissazione delle, 223.  
 Ciglia (colorazione delle), 286.  
 Cipollone (metodo di) al cloruro d'oro, 64.  
 Citologici (metodi), 193, 261.  
 Clepsina (nova di), 214.  
 Cloruro d'oro, 63.  
 » di palladio, 65, 258.  
 di sodio (soluzione fisiologica di), 116, 198.  
 Cocciniglia alluminica di Rahl, 223.  
 Cocchi piogeni, 284.  
 Coe (nova di cestodi), 211.  
 » (nova di cerebratulus), 212.  
 Coggi (embriologia dei plagiostomi), 223.  
 Colera (vibrione del), 285.  
 Collezione di preparati, 144-147.  
 (cartoni e cassette per), 147-148.  
 Collogeno (tessuto), 236.  
 Colofonio in trementina, 122.  
 Coloranti (sostanze), 187.  
 (sostanze) acquisto delle, 44.  
 Colorazione, 42.  
 Colorazione (triplice) del Flemming, 61.  
 delle capsule, 286.  
 cellulare, 196.  
 del centrosoma, 196.  
 delle ciglia, 286.  
 differenziale dei globuli rossi e dei leucociti, 202.  
 Colorazione differenziale dei globuli rossi e dei leucociti (metodo di Foà per la), 203.  
 differenziale dei globuli rossi e dei leucociti (metodo di Kultsehitzky per la), 202.  
 differenziale dei globuli rossi e dei leucociti (metodo Trambusti per la), 203.  
 diretta, 51.  
 indiretta, 51.  
 » progressiva, 51.  
 regressiva, 51.  
 del sangue, 201.  
 delle sezioni, 43, 44.  
 degli spermatozoi, 204-205.  
 delle spore, 286.  
 » in toto, 43.  
 Colorazioni doppie e triple, 57.  
 Colori acidi, 51, 56.  
 di anilina, 50.  
 » basici, 53.  
 » di carminio, 42, 44.  
 dell'ematosilina, 42, 46.  
 » metallici, 62.  
 » neutri, 51, 53.  
 Coltelli, 81.  
 Coltelli (affilatura dei), 82.  
 » (modo di mettere i) nei microtomi a slitta, 88.  
 » di Hermann Haertel, 82.  
 » da microtomo (affilatura dei), 84, 85, 86.  
 » nel microtomo Becker, 92-93.  
 Coltello da microtomo (filo del), 85-86.  
 » obliquo nei microtomi a slitta, 88.  
 Compressione, 132, 133, 134.  
 Compressore di Fol, 133.  
 Compressori, 133.  
 Conchiglia (preparazione della), 279.  
 Connettivi (tessuti), 234.  
 Connettivo (tessuto) preparazione del, 236.  
 Conservazione di preparati, 144.  
 » degli spermatozoi, 204.  
 Contaglobuli Thoma, 167.  
 Contagocce (bottigliette con), 181.  
 Copepodi (preparazione dei), 274.  
 (nova di) fissazione delle, 216.  
 Coprioggetti, 145.  
 Corning (embriologia della Lacerta), 225.  
 Corpi lutei dei mammiferi (fissazione dei), 230.  
 Corpuscoli tattili, 267.  
 Corrosione, 123.  
 Cox, vedi Golgi.  
 Crepidula (embriologia della), 220.  
 Cristallizzatori, 183.  
 Cristatella (sviluppo della), 216.  
 Cromici (sali) come induritori, 40.  
 Cromico (acido) come fissativo, 24.  
 » (acido) come induritore, 40.  
 Cuénot (sangue degli invertebrati), 202.  
 Cuoio da affilare, 82.  
 Cuore, 290.  
 Cute (esame della), 291-292.  
 Cyelas (embriologia della), 221.  
 Cypris (uova di), 216.

**D**

- Daddi (metodo del Sudan III per lo studio del grasso), 237.  
 Davidoff (uova di Distaplia), 222.  
 Decalcificazione, 124.  
 Decalcificazione (metodo di Rousseau per la), 124.  
 Decapodi (uova di) fissazione delle, 217.  
 Degenerazione amiloide, 288.  
     colloide, 288.  
     jalina, 288.  
     » mucosa, 288.  
 Della Valle (sviluppo degli anfipodi), 216.  
 Denti (sezioni dei), 235.  
 Desilicificazione, 125.  
 Diaframma iride, 158.  
 Differenziamento del tessuto muscolare dal connettivo, 238.  
 Difterico (bacillo), 284.  
 Digestione (tecnica della), 131.  
 Direzione delle sezioni, 134.  
 Disegni fatti con la camera chiara (ingrandimenti dati dai), 13.  
     » microscopici, 7, 22.  
 Disidratazione, 66, 67.  
 Dissezione, 131.  
 Dissezione (cassettine da), 179.  
 Dissociazione, 129.  
 Distanza focale equivalente, 160.  
     » frontale, 159.  
 Distaplia (uova di), 222.  
 Dolrn (embriologia dei plagiostomi), 223.  
 Dreysel e Oppler (esame della eleidina), 291.  
 Duval (embriologia degli uccelli), 226.

**E**

- Echini (uova di) fissazione delle, 215.  
 Edema maligno (bacillo dell'), 285.  
 Ehrlich (colorazione delle granulazioni basofile), 289.  
     » (colorazione delle granulazioni neutrofile), 288.  
     » (metodo dell') al blu di metilene, 259, 260.  
     » (metodo dell') per disseccare il sangue, 199.  
     » (metodo dell') al violetto di genziana, 54.  
     » (miscela C dell'), 61.  
     » (miscela triacida dell'), 60.  
 Ehrlich-Biondi-Heidenhain (miscela), 57, 58, 59.  
 Eisen (preparazione del sangue), 199.  
 Eisig (sviluppo della capitella), 215.  
 Erlicki (fissativo dell'), 37.  
 Elettrici (organi), 239.  
 Emacalcio del Mayer, 48.  
 Emallume, 48.  
 Emallume ed eosina, 61.  
     » e fucsina acida, 60.  
     » e indaco-carminio, 61.  
 Emateina (modo di prepararla), 47.

- Emateina I A (metodo dell') per le fibrille nervose, 264.  
     di Apáthy, 48.  
 Ematossilina (colori dell') 42, 46, 47.  
     » (metodo dell') per il sistema nervoso, 262.  
     » ferrica Heidenhain, 49.  
 Ematozoari della malaria, 289.  
 Embriografo, 210.  
 Embriologia degli artropodi, 216.  
     » dei celenterati, 211.  
     » dei metazoi, 210.  
     » dei molluschi, 220.  
     » dei tunicati, 222.  
     » dei vermi, 211.  
     » dei vertebrati, 222.  
 Encefali di mammiferi (fissazione e indurimento d'interi), 240.  
 Engelmann (ciglia vibratili di Anodonta), 279.  
 Enteropneusti (preparazione degli), 272.  
 Eosina, 56.  
 Eosinofile (granulazioni) del sangue, 288.  
 Epiteli (gli), 230.  
 Erlanger (uova di ascaris), 213.  
     (uova di tardigradi), 217.  
 Esame batteriologico di un liquido, 280.  
 Esame diretto del liquido senza sussidio di sostanze coloranti, 281.  
     a fresco della cellula, 193.  
     a fresco di cellule, 129.  
     » a fresco degli spermatozoi, 204.  
     a fresco di tessuti viventi, 129.  
 Esame istologico di un liquido, 280.  
     » del liquido col concorso di sostanze coloranti, 281.  
     » del sangue in circolazione, 201.  
 Eteropodi (preparazione degli), 279.

**F**

- Fabbricanti di microscopi, 155.  
 Falangidi (uova dei) fissazione delle, 217.  
 Fecondazione artificiale, 222.  
 Fegato (esame del), 292.  
     » (preparazione del), 233.  
 Felix (embriologia dei salmoni), 224.  
 Ferreri (floroglucina di), 125.  
 Ferri chirurgici, 179.  
 Ferro nelle cellule (ricerca del), 196.  
 Fibre elastiche (preparazione delle), 231.  
 Fibrina (colorazione della) metodo di Weigert per la, 203.  
 Field e Martin (rivestimento misto), 80.  
 Fish (fissativo del), 38.  
     » (fissazione del cervello), 240.  
 Fissativi (distinzione dei), 24-25.  
     del Lo Bianco, 39.  
 Fissativo del Boveri, 38.  
     di Carnoy e Lebrun, 35.  
     » dell'Erlicki, 37.  
     del Fish, 38.  
     » del Foà, 38.  
     del Fol, 37.  
     del Frenzel, 38.  
     del Gilson, 28.  
     » del Kolbmann, 39.

- Fissativo del Kultschitzky, 38.  
 del Lang (seconda formula del), 38.  
 del Lugol, 38.  
 del Mann, 29.  
 del Merkel, 37.  
 » del Mingazzini, 28.  
 del Mueller, 37.  
 del Perény, 37.  
 del Rabl, 29, 38.  
 del vom Rath, 29, 31.  
 dello Zenker, 38.
- Fissazione (norme più importanti per avere una buona), 25.  
 della cellula, 193.  
 del centrosoma, 194.  
 cellulare (metodi per una buona), 194.  
 dei colori di anilina, 53.  
 e indurimento d'interi encefali di mammiferi, 240.  
 » del sangue, 198-199.  
 del sangue (metodo di Hayem per la), 199.  
 del sangue (metodo di Löwit per la), 199.  
 del sangue (metodo di Nicoforow per la), 200.  
 dei tessuti, 23.
- Flemming (liquido del), 34.  
 (tessuto collogeno), 236.  
 » (triplice colorazione del), 61, 62.
- Fluoroglucina acida per la decalcificazione, 124.
- Foà (fissativo del), 38.  
 » (metodo di) per la colorazione differenziale dei globuli rossi e dei leucociti, 203.
- Fol (compressore del), 133.  
 (fissativo del), 37.  
 (metodo del) per la ricostruzione grafica degli oggetti, 142-143.
- Forbici, 179.
- Formalina (soluzioni di), 36.  
 come induritore, 41.
- Forme di Leuckhart, 78.
- Formol. Vedi Formalina.
- Frankl (forme da paraffina del), 78.
- Freddo come induritore, 23.
- Freuzel (fissativo del), 38.
- Friedlaender (pneumobacillo di), 285.
- Fucsina acida, 56.  
 fenicata dello Ziehl, 283.
- Fusari (cartilagine jalina), 236.
- G**
- Gabbet (blu di metilene di), 283.
- Galeotti (metodo) per la colorazione doppia, 59-60.
- Gardiner (sviluppo dei turbellari), 211.
- Gasteropodi, 220.
- Gasteropodi (preparazione dei), 276.  
 (sistema digerente dei) preparazione del, 279.  
 (uova dei) fissazione delle, 220.
- Gastro-enterico (tubo), 292.
- Gay Lussac (alcolometro di), 176.
- Gefirei (preparazione dei), 271.
- Gelatina e glicerina come mezzi conservativi, 118.
- Genziana (violetto di), 54.
- Geotriton (uova di), 224.
- Ghiandole linfatiche, 291.
- Giacomini (preparazione dell'encefalo), 240.
- Giesbrecht (preparazione dei copepodi), 274.
- Giglio-Tos (preparazione del sangue), 199.
- Gilson (fissativo del), 28.  
 » (liquido conservativo del), 118.  
 » (rivestimento rapido in celloidina), 73.
- Glandole peptiche, 233.  
 » salivari, 292.  
 » secernenti (preparazione delle), 232.
- Glicogeno (ricerca del), 288.
- Globuli rossi (colorazione differenziale dei) e dei leucociti, 202.  
 » rossi (colorazione differenziale dei) metodo di Kultschitzky per la, 202.  
 rossi (colorazione differenziale dei) metodo di Foà per la, 203.  
 rossi (reazione dei), 289.
- Gloclidium (preparazione dei), 221.
- Gocce (numero di) approssimativo corrispondente ad un grammo e ad un centimetro cubo, 189.
- Golgi (corpuscoli del), 267.  
 » (metodo) critica del, 243.  
 » (metodo) dell'impregnazione nera, 242.  
 » (metodo) lento, 245.  
 » (metodo) rapido, 248, 251.
- Golgi-Cox (metodo) reazione nera col; modificato, 254.
- Gomma (soluzione di), 146.
- Gomma-sciroppo di Apáthy, 119.
- Gori Fr. (provvista di animali terrestri), 16.
- Gram (metodo di), 282.
- Granulazioni basofile del sangue, 288.  
 » eosinofile del sangue, 288.  
 » neutrofile del sangue, 288.
- Grassi (uso della formalina), 36.
- Greenough (microscopio binoculare di) con sostegno mobile in tutte le direzioni, secondo Braus e Druener, 171.
- Groot (de) J. G. (microtomo a leva del), 104.
- Grübler (acido osmico del), 33.  
 » (picrocarminato di magnesia del), 46.  
 (sostanze coloranti del), 44.
- H**
- Hayem (metodo di) per la fissazione del sangue, 199.
- Haywood (rasoi di), 102.

Heidenhain (ematossilina ferrea secondo), 49.  
 Henking (sviluppo degli insetti), 218.  
 (uova di falangidi), 217.  
 Hermaun (liquido dell'), 35.  
 » (spematozoi di Seyllinum), 205.  
 Heymons (uova d'insetti), 217.  
 Hirudo (preparazione dell'), 272.  
 (uova dell'), 214.  
 Hoehl (studio del connettivo), 237.  
 Hofzelle, 261.  
 Holoturie (sviluppo delle), 215.  
 Hoyer (nucleo di Colpidium), 209.  
 » (ricerca della mucina), 233.  
 Huyghens (oculari), 163.

**I**

Illuminatore verticale, 167.  
 Imbianchimento, 125.  
 Imbuti, 183.  
 Impregnazione, 62.  
 Impregnazione (doppia) processo della, 251.  
 » nera (metodo Golgi dell'), 242.  
 Inchiostro di Schöbel, 146.  
 Indice di rifrazione di alcune sostanze, 69.  
 Indurimento, 40.  
 Indurimento dei tessuti, 23.  
 Influenza (bacillo dell'), 285.  
 Infusori cigliati, 206, 207, 208.  
 Inghillieri (colorazione delle granulazioni eosinofile del sangue), 288.  
 Ingrandimenti, 13, 160, 164.  
 Iniezioni di sistemi d'organi, 131.  
 Insetti (uova degli) fissazione delle, 217.  
 Irudinei (preparazione degli), 272.  
 » (uova degli) fissazione delle, 214.  
 Istologia patologica (tecnica dell'), 280.  
 Istologo (orario dell'), 4.  
 Iwanzoff (organi elettrici), 239.

**J**

Jatta (embriologia della Sepia e della Loligo), 222.  
 Javelle (acqua di), 122.  
 Jennings (sviluppo dei rotiferi), 212.  
 Jordan (apparecchio di) per orientare piccoli embrioni), 297.  
 Jung (microtomo di), 95.  
 Jungia (uova di), 212.

**K**

Karawaiew (sviluppo del Lasius), 274.  
 Kényon (cervello dell'ape), 275.  
 Kernschwarz, 56.  
 Kingsley (uova di Limulus), 217.  
 Kishinouye (uova di Limulus), 217.  
 » (uova di araneidi), 217.  
 Kleinenberg (liquido del), 32.  
 Knoll (fissazione del sangue), 201.  
 Koch (sviluppo della Caryophyllia), 211.

Köllicker (uova di mammifero), 227.  
 Kollmann (fissativo del), 36.  
 Kolster (glandule peptiche), 233.  
 Kopsch (apparecchio per embriologia di), 297.  
 Korotneff (embriologia delle salpe), 222.  
 Korschelt (uova di Ophryotrocha), 214.  
 Kostanecki (uova di Asearis), 213.  
 » (uova di Myzostoma), 215.  
 Kronthal (critica del metodo Golgi), 243.  
 Kultschitzky (metodo di) per la colorazione differenziale dei globuli rossi e dei leucociti, 202.  
 » (fissativo del), 38.  
 Kupffer (embriologia dei ciclostomi), 223.

**L**

Labarraque (acqua di), 122.  
 Laboratorio, 149, 150, 151, 152.  
 » (materiale necessario nel), 176.  
 Lacerta (embriologia della), 225.  
 Lachi (fissazione del cervello), 240.  
 Lamelibranchi (come si narcotizzano i), 275.  
 (preparazione dei), 275.  
 (uova di) fissazione delle, 221.  
 Lampadina microchimica, 177.  
 Lampreda (sangue di), 203.  
 Lang (fissativo del) seconda formula del, 38.  
 Larve di diversi animali (preparazione delle), 270.  
 Lasius (embriologia del), 274.  
 Lastre da preparati, 144.  
 » da preparati (indicazioni sulle), 146.  
 Lavalette St. George (spematozoi di Bombyx), 205.  
 Lavdowsky (formalina alcoolica di), 36.  
 Laveran (colorazione degli ematozoari malarici), 290.  
 Lebbra (bacillo della), 283.  
 Lécaillon (uova di coleotteri), 218.  
 Lee (rivestimento a secco in celloidina), 74.  
 (uso della formalina), 36.  
 Lenhossék (spemmatogenesi del Mus), 205.  
 Lente aplanatica, 170.  
 di Brücke, 18, 170.  
 » frontale dell'obiettivo, 159.  
 Leuckhart (forme di), 78.  
 Leya (microtomo a) di J. G. de Groot, 104.  
 Levi Gius. (metodo Biondi per lo studio del nucleo), 58.  
 Lewis M. (sistema nervoso dei policheti), 273.  
 Lichtgrün, 56.  
 Lillie (embriologia dell'Unio), 221.  
 Limax (embriologia della), 220.  
 Liquidi conservativi, 115, 117.  
 che evaporano, 188.  
 indifferenti, 115-116.  
 del Pacini, 117.

Liquido (esame del), 281.  
 (esame batteriologico di un), 280.  
 di Apáthy per la conservazione, 130.  
 » del Brnn, 118.  
 » del Calberla, 117.  
 del Flemming, 34.  
 del Gilson, 118.  
 dell'Hermann, 35.  
 del Kleinenberg, 32.  
 » del Mueller come induritore, 40.  
 di Ripart e Petit, 118.  
 List (ricerca del ferro), 197.  
 Livini (fibre elastiche), 231.  
 Lo Bianco (fissativi del), 39.  
 » (liquido fissativo del), 297.  
 » (maturità scssuale degli animali marini), 211.  
 (preparazione, anestesia, conservazione di animali marini). Vedi Prefazione.  
 » (preparazione di animali), 270.  
 Loeffler (blu di metilene di), 281.  
 » (soluzione colorante di) per lo studio delle ciglia dei batteri, 286.  
 Loligo (embriologia del), 222.  
 Lombricus (preparazione del), 272.  
 Löwit (metodo di) per la fissazione del sangue, 199, 201.  
 Löwit-Cipollone (metodo del cloruro d'oro), 64.  
 Löwit-Ranvier (metodo del cloruro d'oro), 63.  
 Luce per il microscopio, 5.  
 Luce polarizzata (apparecchio per la), 166.  
 Ludwig (spilli del), 179.  
 Lugol (fissativo del), 38.  
 Lutei (corpi) dei mammiferi; fissazione dei, 230.

**M**

Maas (nova e larve di spugne), 211.  
 Macallum (ricerca del ferro nel nucleo), 197.  
 Macerazione, 130.  
 Macerazione degli spermatozoi, 204.  
 Magen (apparecchio per embriologia), 297.  
 Malachite verde, 56.  
 Malaria (ematozoi della), 290.  
 Mammiferi (corpi lutei dei) fissazione dei, 230.  
 (embriologia dei), 227.  
 Manganeso (cloruro di) soluzione di, 117.  
 Mann (fissativo del), 29.  
 Maragliano e Castellini (colorazione del sangue), 289.  
 Marchi (degenerazione dei nervi), 258.  
 Martin, vedi Field.  
 Masslow (preparazione del sangue), 200.  
 Mastzellen, 236.  
 Materiale microscopico, 14, 16, 17.  
 » necessario nel laboratorio, 176.  
 Matracci, 184.

Mayer (acido piero-nitrico del), 39.  
 (albumina glicerinata del), 109.  
 » (composizione del cloruro d'oro), 63.  
 » (decalcificazione), 124.  
 » (emacalcio del), 48.  
 » (fissazione delle nova di Palinurus), 217.  
 » (imbianchimento dei pezzi aumeriti dall'acido osmico), 125.  
 (metodo per levare l'acido cromoico), 39.  
 (microscopio semplice del), 171.  
 » (piero-carminato di magnesia), 46.  
 (ricerca della mucina), 232.  
 » (teoria dei colori dell'euatossilina), 47.  
 » (violetto di metile nel verde di metile), 55.  
 Mayer e List (ricerca della mucina), 232.  
 Mayer e Schoebel (reggicoltello di), 297.  
 Mazzoni (corpusecoli del), 267.  
 Meisenheimer (embriologia della Limax), 220.  
 Merck (alcol di), 186.  
 Merkel (fissativo del), 37.  
 Metazoi (embriologia dei), 210.  
 Metile (verde di), 55.  
 Metilene (blu di), 54.  
 Metili blu, 56.  
 Metodi dell'Apáthy per lo studio delle fibrille nervose, 263.  
 » al blu di metilene, 259.  
 » citologici, 193.  
 » citologici per lo studio del sistema nervoso, 261.  
 » istologici, 230.  
 Metodo di Apáthy per tenere attaccate le sezioni delicate, 114.  
 » di Arnold per la dissecazione del sangue, 200.  
 » Bethe, 260.  
 di Bizzozero per la dissecazione del sangue, 201.  
 » di Bizzozero per la preparazione delle piastrine, 203.  
 di Born per l'orientamento degli oggetti, 137.  
 di colorazione Biondi, 57, 262.  
 » del cloruro d'oro a fresco di Apáthy, 263.  
 del cloruro d'oro per le sezioni, 264.  
 dell'emateina I A, 264.  
 dell'ematosilina, 262.  
 » di Ehrlich per disseccare il sangue, 199.  
 di Foà per la colorazione differenziale dei globuli rossi e dei leucociti, 203.  
 » Fol per la ricostruzione grafica degli oggetti, 142-143.  
 Galeotti per la colorazione doppia, 59-60.  
 » Golgi (critica del), 243.  
 Golgi dell'impregnazione nera, 242.  
 Golgi lento, 245.  
 » Golgi rapido, 248, 251.

Metodo di Gram, 282.  
 » di Hayem per la fissazione del sangue, 199.  
 di Kultschitzky per la colorazione differenziale dei globuli rossi e dei leucociti, 202.  
 di Löwit per la fissazione del sangue, 199.  
 Löwit-Cipollone del cloruro d'oro, 64.  
 Löwit-Ranvier del cloruro d'oro, 63.  
 Marchi, 258.  
 di Nikiforow per la dissecazione del sangue, 200.  
 » Nissl, modificato, 262.  
 » Paladino, 258.  
 del ringiovanimento, secondo Golgi, 256.  
 di Rousseau per la decalcificazione, 124.  
 di Weigert, 256.  
 di Weigert 1891, 257.  
 di Weigert per la preparazione e colorazione della fibrina, 203.  
 » di Weigert-Pal, 258.  
 » di Woodworth per l'orientamento degli oggetti, 139.  
 Meves (preparazione dello sperma), 204.  
 Michael (uccisione degli acari), 275.  
 Microfotografia, 6.  
 Micrometro per l'obiettivo, 167.  
 » oculare, 166.  
 » oculare a rete, 167.  
 Microrganismi colorabili col metodo di Gram, 282.  
 » nei tessuti (ricerca dei), 293.  
 Microscopi (fabbricanti di), 155.  
 Microscopio (come si conserva il), 168.  
 (come si lavora al), 3.  
 » (luce per il), 5.  
 » (osservazione al), 20.  
 » (riparo per il), 177.  
 » (ripulitura del), 169-170.  
 Microscopio binoculare di Greenough con sostegno mobile in tutte le direzioni, secondo Braus e Druener, 171.  
 » composto (descrizione del), 153.  
 » semplice (quando si deve adoperare il), 18.  
 » semplice del Mayer, 171.  
 Microscopista (qualità necessarie al), 3.  
 Microtomi, 81, 86, 89, 90, 91.  
 Microtomo Becker, 91.  
 » a bilico Cambridge-Jung, 99.  
 » lento (descrizione del), 89.  
 » a leva di J. G. de Groot, 104.  
 » Minot-Zimmermann, 89.  
 » Reinhold-Giltay, 89.  
 » di Schanze-Reichert, 87.  
 » Thoma-Jung, 95.  
 Midollo osseo, 291.  
 Miller (cauciù del), 120.  
 Milza (esame della), 291.  
 (preparazione della), 234.

Mingazzini (fissativo del), 28.  
 Minot-Zimmermann (microtomo), 89.  
 Miscela C dell'Ehrlich, 61.  
 Miscela Ehrlich-Biondi-Heidenhain, 57.  
 » triacida dell'Ehrlich, 60.  
 Möbusz (intestino di Anthrenus), 274.  
 Moll (polveri del) per affilare i coltelli, 85-86.  
 Molluschi (ciglia vibratili dei) preparazione delle, 279.  
 » (embriologia dei), 220.  
 » (nervi dei) studio microscopico dei, 276.  
 (preparazione dei), 275.  
 (sistema nervoso centrale e periferico dei) preparazione del, 277.  
 Montgomery (preparazione dei nemertini), 271.  
 » (spermatogenesi negli cmitteri), 206.  
 Monticelli (compressore), 133.  
 Morgan (uova di rana), 224.  
 Morva (bacillo della) nei tessuti; ricerca del, 294.  
 Mucemateina, 232.  
 Mucicarmin, 232.  
 Mucina (ricerca della), 232.  
 Mucosa dell'apparato digerente, 232.  
 Mucose, 291.  
 Mueller (colorazione dei batteri e delle spore), 286.  
 » (fissativo del), 37.  
 » (liquido) come induritore, 40.  
 » (preparazione di ostracodi), 274.  
 Münder (sostanze coloranti del), 44.  
 Mus (uova di), 227, 228.  
 Muscolare (tessuto), 237, 292.  
 Muscoli striati, 238.  
 trichinati, vedi Trichina.  
 » trichinati (esame dei), 295.  
 Myzostoma (preparazione del), 272.  
 (uova di) fissazione delle, 215.

## N

Nachet (prisma di), 8.  
 Najadi (branchie di) preparazione delle, 279.  
 » (embriologia delle), 221.  
 Nebenkern (studio del), 65.  
 Negozianti di reagenti, 188.  
 Nematodi (uova dei) fissazione delle, 212.  
 » (preparazione dei), 271.  
 Nemertini (preparazione dei), 271.  
 » (uova dei) fissazione delle, 212.  
 Nephelis (uova di), 214.  
 Nereis (uova di), 214-215.  
 Nervoso (sistema), 293.  
 Neutrofile (granulazioni) del sangue, 288.  
 Nevrogli (studio della), 266.  
 Nicolle (violetto di genziana di), 284.  
 Niessing (spermatogenesi), 205.

Nikiforow (metodo di) per la fissazione del sangue, 200.  
 Nissl (metodo) modificato, 262.  
 Nitrato d'argento, 63.  
 Note (necessità delle), 22.

## O

Oberhäuser (camera chiara di), 9.  
 Obiettivi, 158, 162.  
 » aeromatici, 163.  
 » aeromatici (tabella degli) e degli oculari Huyghens, secondo Koritska, 174.  
 » apoeromatici, 163.  
 » apoeromatici (tabella degli) e degli oculari compensatori, 175.  
 » ad immersione omogenea, 162.  
 » a secco, 160.  
 Obiettivo (descrizione dell'), 159.  
 D\* Zeiss, 165.  
 » ad immersione (quando si deve adoperare l'), 19-20.  
 » semiapocromatico, 165.  
 Occhio, 268.  
 » in toto (preparazione dell'), 269.  
 Oculare del microscopio composto, 154.  
 Oculari, 158.  
 compensatori, 163.  
 Huyghens, 163.  
 Ofuridi (uova di), 215.  
 Oligocheti (preparazione degli), 272.  
 » (uova degli) fissazione delle, 214.  
 Oli essenziali, 187.  
 Ophryotrocha (uova di), 214.  
 Oppler, vedi Dreysel.  
 Orange G., 56, 57.  
 Orario dell'istologo, 4.  
 Orceina, 57.  
 Orecchio interno, 268.  
 Organi elettrici, 239.  
 » genitali, 292.  
 » dei sensi, 239, 267.  
 Organo intiero (fissazione di un), 26.  
 Organismi pelagici, 125, 126, 127.  
 Orientamento degli oggetti (metodo di Born per l'), 137.  
 degli oggetti (metodo di Woodworth per l'), 189.  
 » di oggetti difficili, 134.  
 Oro (cloruro d'), 63.  
 Osmico (acido) e cloruro d'oro, 65.  
 » (acido) come fissativo, 24, 32.  
 » (acido) e pirogallio, 65.  
 » (acido) soluzioni di, 33.  
 Osmio (tetrossido di) come fissativo, 24, 32.  
 Osmio-acetica (soluzione), 193.  
 Ossa (preparazione delle), 234.  
 Osseo (midollo), 291.  
 » (tessuto), 234, 292.  
 Osservazione a fresco, 211.  
 delle uova, 210.  
 Osservazioni diverse, 125.  
 al microscopio, 20.

Osso fresco (sezioni di), 235.  
 Ostracodi (preparazione degli), 274,  
 (uova dei) fissazione delle, 216.  
 Ozena (bacillo dell'), 285.

## P

Pacini (corpuseoli del), 267,  
 » (liquidi del), 117.  
 Paladino (metodo), 258.  
 Palinurus (occhio di), 274.  
 » (sviluppo del), 217.  
 Palladio (cloruro di), 65, 258.  
 Pancreas, 232, 292.  
 Paracarminio, 45.  
 Paraffina (rivestimento con la), 70-77.  
 Parassiti del canero (ricerca dei), 294-295.  
 Patten (uova d'insetti), 217.  
 Peli (preparazione dei), 239.  
 Pelle (la), 230.  
 Perény (fissativo del), 37.  
 Pesci (uova dei) fissazione delle, 223.  
 Peso specifico di alcune sostanze, 190.  
 Peste (bacillo della), 285.  
 Peter (vedi Born), 137.  
 Petromyzon (fecondazione artificiale del), 222.  
 Pezzi (rivestimento dei), 70.  
 » fissati (come si lavano i), 39.  
 Pfeiffer (colorazione dei batteri nei tessuti), 293.  
 Pfitzner (saffranina di), 53.  
 Phalacrocera (uova di), 218.  
 Phyllosoma (preparazione del), 274.  
 Piastrine (preparazione delle), 203.  
 (preparazione delle) metodo di Bizzozero per la, 203.  
 Picrico (acido) come fissativo, 24, 31.  
 Picro-carminato di ammoniaca, 46.  
 » di magnesia, 46.  
 Picro-carminio, 46.  
 Picro-solforico (acido), 32.  
 Pietre da affilare, 82.  
 Piliidium (preparazione dei), 212.  
 Pinzette, 179.  
 Pipette contagocce, 183.  
 Placche motrici, 238.  
 Plagiostomi (embriologia dei), 223.  
 Plankton, 125-128.  
 Plasmatiche (cellule), 236.  
 Platydaetylus (uova di), 225.  
 Pneumo-bacillo di Friedlaender, 285.  
 Policheti (preparazione dei), 272.  
 » (uova dei) fissazione delle, 214-215.  
 Polveri da affilare, 85.  
 Pontobdella (preparazione della), 272.  
 » (uova di), 214.  
 Porcellana (oggetti di), 180.  
 Porcellio (preparazione del), 274.  
 Poriferi (preparazione dei), 270.  
 Portacoltello, 87, 91.  
 Portaoggetti, 144.  
 » (indicazioni sui), 146.  
 incavato, 184.  
 Preparati (chiusura dei), 122.  
 » (collezione di), 144, 147, 148.  
 » permanenti in toto, 132.

Preparazione di animali, 131.  
 » del blocco, 78.  
 Preparazioni, 125.  
 Prisma di Nacet, 8.  
 Processo della doppia impregnazione, 251.  
 Protozoi, 206.  
 Protozoi, 206.  
 » (nuclei di), 209.  
 Pteropodi (preparazione dei), 279.

## Q

Queyriaux (gomma di), 146.

## R

Rabl (cocciniglia alluminica del), 228.  
 » (fissativo del), 29, 38.  
 » (metodi embriologici del) pei vertebrati, 227-228.  
 Raffaele (embriologia dei plagiostomi), 223.  
 » (larve di teleostei), 223-224.  
 Raja (organo elettrico della coda di), 239.  
 Ramon y Cajal, vedi Cajal.  
 Rana (uova di), 224.  
 Ranvier (alcool al terzo di), 130.  
 » (metodi di) al cloruro d'oro, 63, 64.  
 » (metodo di) per la preparazione delle ossa, 234, 235.  
 Rasoio (affilatura del), 81, 82, 83, 84.  
 Rath (vedi vom Rath).  
 Reagenti, 184.  
 Reazione nera (la) e la neuroglia, 253.  
 nera (la) nei vertebrati inferiori e negli invertebrati, 254.  
 nera col metodo Golgi-Cox, modificato, 254.  
 Recipienti graduati, 176.  
 Reggi-coltello di Apáthy, 85, 99.  
 Reichert (termoregolatore di), 178.  
 Reinchenbach (sviluppo dell' Astacus), 217.  
 Reinhold-Giltay (microtomo), 89.  
 Reineke (studio dell'epidermide), 231.  
 » (uova di echini), 216.  
 René (preparazione del), 233, 292.  
 Resina Damar, 120.  
 Resine, 115, 120.  
 Respiratorio (apparato), 292.  
 Retina (preparazione della), 268.  
 Rettili (uova dei) fissazione delle, 225.  
 Revolver, 165.  
 Ricostruzione grafica degli oggetti, 140.  
 » grafica degli oggetti (metodo F'ol per la), 142-143.  
 delle sezioni, 134.  
 solida degli oggetti, 141.  
 Riegel (affilatura dei coltelli), 82.  
 Rifrazione (indice di) di alcune sostanze, 69.  
 Ringiovanimento (metodo del) secondo Golgi, 256.  
 Rinoscleroma (bacillo del), 225.  
 Riparo per il microscopio, 177.

Ripart e Petit (liquido del), 115.  
 Rischiamento, 66-67.  
 Rivestimento con la celloidina, 70, 71, 72, 73.  
 misto, 79, 80, 81.  
 con la paraffina, 74, 75, 76, 77.  
 » dei pezzi, 70.  
 Romanowsky (colorazione degli ematozoi malarici), 290.  
 Rossi (uova di anfi), 224.  
 Rotiferi (preparazione dei), 271.  
 » (uova di) fissazione delle, 212.  
 Rousseau (metodo di) per la decalcificazione, 124.  
 Rousselet (preparazione dei rotiferi), 271.  
 Rubin S., 56.  
 Ruffini (corpuscoli del), 267.  
 Russel (metodo) per l'esame istologico dei tessuti, 287.  
 Russo (sviluppo degli echinodermi), 215.

## S

Saffranina, 53, 61.  
 di Pätzner, 53.  
 ed acqua blu, 61.  
 » e verde luce, 61.  
 Salamandrina (uova di), 224.  
 Sali cromatici come induritori, 40.  
 Sali metallici (azione dei) sui tessuti, 62.  
 Salicic, 183.  
 Salpa (embriologia della), 222.  
 Samassa (liquido di), 210.  
 » (rivestimento misto di), 80.  
 » (uova di Amphioxus), 223.  
 Sanfelice (colorazione dei parassiti del cenere), 294-295.  
 Sangue (colorazione del), 201.  
 » (colorazione differenziale del) secondo Trambusti, 203.  
 (dissecazione del) metodo di Arnold per la, 200.  
 (dissecazione del) metodo di Bizozero per la, 201.  
 » (dissecazione del) metodo di Ehrlich per la, 199.  
 (dissecazione del) metodo di Nikiforow per la, 200.  
 » (esame batteriologico del), 289.  
 (esame a fresco del), 198.  
 (fissazione del), 198-199.  
 » (fissazione del) metodo di Hayem per la, 199.  
 (fissazione del) metodo di Löwit per la, 199.  
 (granulazioni basofile del), 228, 289.  
 » (granulazioni eosinofile del), 288.  
 (granulazioni neutrofile del), 288.  
 » (studio del), 198.  
 (studio del) materiale di ricerca per lo, 204.  
 » in circolazione (esame del), 201.  
 » nel tessuto (studio del), 202.  
 Sapphirina (fissazione della), 274.  
 Scatole rettangolari, 182.



Todaro (fissazione delle salpe), 279.  
 Torpedo (organi elettrici della), 239.  
 Topo, vedi Mus.  
 Trambusti (colorazione differenziale del sangue), 203.  
 Trattamento delle sezioni attaccate, 111.  
 Trematodi (preparazione dei), 271.  
 » (uova dei) fissazione delle, 211.  
 Tremantina veneziana in alcool assoluto, 122.  
 Trichina (dimostrazione della), 271, 295.  
 Trichinati (muscoli) esame dei, 295.  
 Triplice colorazione di Apáthy, 238.  
 Tubercolari (bacilli), 283.  
 » (bacilli) nei tessuti; ricerca dei, 293-294.  
 Tubi di vetro, 183.  
 Tubo con coperchio, 112.  
 gastro-enterico (esame del), 292.  
 di gomma, 178.  
 Tunicati (embriologia dei), 222.  
 » (preparazione dei), 279.  
 Turbellari, 211, 270.

## U

Uccelli (uova degli) fissazione delle, 226.  
 Uccisione di animali, 131.  
 Ulcera molle (streptobacillo dell'), 285.  
 Unghie (preparazione delle), 231.  
 Unio (embriologia dell'), 221.  
 Unna (studio del tessuto collogeno e delle mastzellen), 236.  
 » (teoria sui colori di ematossilina), 47.  
 Unna-Taenzer (fibre elastiche), 231.  
 Uova (osservazione delle), 210.  
 » degli anfi, 224.  
 » dell'anfioso, 223.  
 » degli aracnidi, 217.  
 » dei cefalopodi, 221.  
 » dei ciclostomi, 223.  
 » dei copepodi, 216.  
 » dei decapodi, 217.  
 » degli echini, 215.  
 » dei falangidi, 217.  
 » dei gasteropodi, 220.  
 » degli insetti, 217.  
 » degli irudinei, 214.  
 » dei lamellibranchi, 221.  
 » di limulus, 217.  
 » dei mammiferi, 227.  
 » di myzostoma, 215.  
 » dei nematodi, 212.  
 » dei nemertini, 212.  
 » degli ostracodi, 216.  
 » dei pesci, 223.  
 » dei policheti, 213.  
 » dei rettili, 225.  
 » delle salpe, 222.  
 » degli scorpionidi, 217.

## V

Vau Beneden, 35.  
 » (uova di trematodi), 211.  
 Van Gieson (metodo di colorazione di), 291.  
 Van der Stricht (uova di Thysanozoon), 212.  
 Vasetti cilindrici, 181.  
 » per l'olio da immersione, 182.  
 » per le resine, 182.  
 Vasi, 180.  
 Vasi sanguigni, 290.  
 Vater (corpuscoli del), 267.  
 Verde di metile, 55.  
 » jodo, 56.  
 » luce, 56.  
 Vermi (embriologia dei), 211.  
 » (preparazione dei), 270.  
 » (sistema nervoso dei) preparazione del, 272.  
 Vernici, 115.  
 Vernici per lutare le preparazioni, 119.  
 Vertebrati (embriologia dei), 222.  
 » (metodi embriologici per i) ricapitolazione sui, 229.  
 Vetri (sgrassamento dei), 107.  
 » da orologio, 183.  
 Vetrini, 145.  
 » già attaccati (come si staccano i), 123.  
 Vetro (oggetti di), 180.  
 Viallanes (occhi del Palinurus), 274.  
 » (metodo del) al cloruro d'oro, 65.  
 » (nervi dell'apparato digerente dei polmonati), 276.  
 Vialleton (embriologia dei cefalopodi), 221.  
 Vibrione colerico, 285.  
 Violetto di genziana, 54.  
 » di genziana di Nicolle, 284.  
 Vite a cremagliera del microscopio composto, 154.  
 Volk (preparazione dei rotiferi), 271.  
 Vom Rath (fissativi del), 29, 31.  
 » (uova di copepodi), 216.  
 Vosseler (chiusura dei preparati), 122.

## W

Walb (coltelli da microtomo), 81.  
 Weigert (metodo di), 256.  
 » (metodo di) 1891, 257.  
 » (metodo di) per la preparazione della fibrina, 203.  
 » (metodo di) per lo studio della nevrogliá, 266.  
 Weigert-Pal (metodo di), 258.  
 Wheeler (sviluppo del Myzostoma), 215.  
 » (uova d'insetti), 217.





