

Istituto di Zoologia dell'Università di L'Aquila, Italia

CURVA DI CRESCITA IN POPOLAZIONI DI *RHABDITIS AXEI*
(NEMATODA: RHABDITIDAE)
IN UN NUOVO TERRENO COLTURALE⁽¹⁾

di

B. CICOLANI e G. MANILLA

Rhabditis (*Rhabditella*) *axei* (Cobbold, 1884) si rinviene frequentemente, come altri rappresentanti del suo genere, in escrementi di vari animali. Tali nematodi a vita libera hanno bisogno, infatti, d'ambienti ad alta attività batterica, derivanti dalla decomposizione di sostanze organiche (Thorne, 1961).

Le metodiche più seguite per il loro allevamento di massa sono quelle adottate da Rodriguez *et al.* (1962), da Singh e Rodriguez (1966) e da Ito (1972).

I primi AA, utilizzando diverse specie di nematodi e saggiando più terreni, individuarono un adatto substrato nello stesso terreno colturale già usato per allevare larve di mosca (C.S.M.A. della Ralston Purina Co.) bagnandolo con una soluzione di NaOH 1/12 N in proporzione 1:2,5 in peso. In tal modo essi ottennero, dopo 4 giorni, 7,5 ml di nematodi su una superficie di 516 cm², con una semina di 0,25 ml di *Rhabditella* sp., a 27,5 °C e 60% di U. R.

Singh e Rodriguez, mantenendo lo stesso substrato, modificarono le tecniche di semina e di raccolta, ottenendo vantaggi nell'economia di tempo e di spazio.

Ito ottenne soddisfacenti rendimenti aggiungendo a un terreno contenente agar al 2,5%, il 10% di lievito secco.

I citati substrati non agarizzati si sono aggiunti alla lista dei

⁽¹⁾ Growth curve of populations of *Rhabditis axei* (Nematoda: Rhabditidae) in a new cultural medium.

terreni agar-nutrienti, già suggeriti per l'allevamento di nematodi da altri Autori (Nigon, 1949; Dougherty, 1960).

I substrati con agar sono apparsi anche a noi particolarmente indicati per ricerche di autoecologia, che presuppongono studi dettagliati sui parametri biologici; questi, però, sono condizionati sempre dalla disponibilità di allevamenti di massa rapidi, economici ed imponenti, che non possono essere ottenuti con substrati agarizzati.

Tale necessità ci ha indotti a ricercare nuovi terreni con sostanze organiche, che garantissero alto rendimento, rapidità ed economicità.

Sul migliore di essi abbiamo poi condotto ricerche per accertare l'optimum di temperatura e di pH per quanto riguarda il rendimento colturale nonché la curva di crescita di *R. axei*.

MATERIALI E METODI

Il ceppo di *Rh. axei* da noi utilizzato è stato fondato con esemplari isolati, con imbuti Baermann, da sterco di vitello proveniente da una zona dell'agro pontino. Subito dopo l'estrazione, i nematodi sono stati trasferiti su terreno di Nigon e dopo 6 giorni seminati nel terreno di Rodriguez e Coll (C.S.M.A.) sì da ottenere i primi allevamenti.

La difficile reperibilità e l'incostanza delle caratteristiche fisico-chimiche di tale terreno, nonché gli inconvenienti di cui s'è già detto per il terreno agarizzato, ci hanno suggerito di saggiare i seguenti componenti: crusca di frumento e farine d'erba medica, di grano, di mais, di soia e di pesce nonché semi di grano, di mais e d'avena, vitamine in cristalli, sterco di vitello disidratato e macinato e lievito di birra.

Ciascun componente è stato utilizzato sia singolarmente sia in combinazione percentuale diversa con ognuno degli altri, utilizzando contenitori quadrati di plastica (10 x 10 x 7 cm) ricoperti con garza.

I terreni di coltura sono stati inizialmente bagnati con soluzione di NaOH, usato come micostatico, a diverse concentrazioni; il loro pH è stato misurato quotidianamente con pHmetro Pye mod. 78 della Leitz, elettrodo di vetro aghiforme mod. G.640 della Philips ed elettrodo di riferimento a doppia giunzione della Orion.

Per ogni prova sono state saggiate le temperature 15, 20, 25, 30

e 35 °C, utilizzando celle climatiche I.H.-227 e I.H.-287 della Galenkamp provviste di ventilatore per rapida circolazione interna e di un programmatore per le temperature e i tempi desiderati. L'U.R. è stata mantenuta a 60% con soluzioni sature di NaCl messe in appositi essiccatori mentre l'evaporazione è stata compensata con quotidiana ed opportuna aggiunta di acqua. Tutte le colture sono state interrotte al 7° giorno e per ogni prova sono state effettuate tre repliche.

La tecnica usata per seguire nel tempo l'andamento di una popolazione di *Rh. axei* è stata la seguente: i nematodi, messi in imbuto Baermann e raccolti in acqua dopo 4 ore, sono stati lasciati sedimentare per circa 15' in cilindri di vetro e quindi trasferiti, insieme con parte dell'acqua, in provette di 10 ml e centrifugati a 1500 giri/m per 1'30". Immediatamente dopo s'è operato in modo da mantenere il rapporto nematodi/acqua costante (1:1), al fine di utilizzare per ogni semina 0,25 ml di *Rh. axei* e 0,25 ml di acqua che sono stati inoculati nei contenitori, ciascuno dei quali conteneva 50 g di substrato bagnato con NaOH 1/10 N.

RISULTATI

Quattro componenti (le farine di grano, di mais, di pesce e la crusca) saggiati singolarmente non hanno permesso lo sviluppo di nematodi. Lo sterco di vitello, la farina di soja e quella d'erba medica, individualmente provati, hanno consentito l'accrescimento della popolazione di *Rh. axei*, anche se le dimensioni e il numero degli esemplari sono risultati inferiori a quelli degli allevamenti in C.S.M.A.

La crusca, che isolatamente provocava un rapido abbassamento del pH nel mezzo, unita con altri componenti s'è dimostrata, invece, valido ingrediente. Fra i semi di grano, d'avena e di mais, aggiunti anche al fine di conferire porosità al substrato, i primi si sono rivelati più idonei. L'apporto, in piccole percentuali, di lievito di birra o di vitamine non ha inciso sensibilmente sul rendimento colturale, sicchè, anche per evitare un substrato troppo elaborato, è stato deciso di escludere tali componenti, nonché quelli (farine di grano, di mais e di pesce) la cui presenza provocava una rapida acidificazione del mezzo.

Le successive prove sono state condotte su terreni formati coi

componenti più redditizi, utilizzandoli alle 5 temperature, in composizioni percentuali diverse. Il migliore terreno colturale è risultato essere quello composto (in peso su 50 g) da 30% di sterco di vitello disseccato e macinato, 8% di farina di soia, 25% di semi di grano, 20% di crusca di frumento e 17% di farina d'erba medica.

Al fine di individuare anche la concentrazione di NaOH più favorevole, sono state provate le concentrazioni 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 e 1/25 N, facendo tre repliche per ognuna delle 5 temperature. L'elaborazione dei risultati relativi alle migliori produzioni non ha evidenziato, in ciascuna delle temperature, differenze dovute alle concentrazioni di NaOH comprese tra 1/10 e 1/15 N, sicchè nella successiva fase delle ricerche è stata utilizzata solo la prima di tali concentrazioni.

Evidenziato il migliore terreno colturale, scelta la concentrazione di NaOH e ormai standardizzata la metodica, sono stati determinati l'intervallo di temperatura e di pH ottimali per il rendimento colturale, nonchè la curva di crescita alla temperatura centrale del suddetto intervallo.

Utilizzando esperimenti preliminari relativi al limite superiore e a quello inferiore di temperatura per questa specie, abbiamo effettuato prove nell'intervallo compreso tra 15 °C e 33 °C, con sbalzi di 3 °C. In ciascuno dei contenitori già descritti sono stati posti 50 g di terreno colturale, 100 cc di NaOH 1/10 N e, nei giorni successivi alla semina, acqua fino ad ottenere un adeguato tenore di umidità. Ad ogni temperatura sono state effettuate 15 repliche.

I risultati, con l'elaborazione statistica dei dati, sono riportati nella tabella I.

Confrontando col « t » di Student i valori medi ottenuti si è notato che dopo 7 giorni in contenitori con 50 g di terreno, su una superficie di 100 cm² (altezza del terreno pari a circa 3 cm), la massima produzione è stata di 8,05 ml di nematodi alla temperatura di 21 °C, valore statisticamente diverso da tutti gli altri.

Attraverso diluizioni successive, fissaggio in T.A.F. ed esame microscopico, effettuato in capsule Petri con diametro di 8 cm. e provviste di reticolo, è stato possibile stimare mediamente 600.000 nematodi per ogni ml nella diluizione 1:1, sicchè la produzione massima stimata è risultata pari a 4.830.000 con un inoculo di 150.000.

I risultati sono superiori a quelli ottenuti da Rodriguez e Coll, poichè a parità di semina è stata ottenuta una maggiore produzione

su una superficie pari a 1/5 di quella usata dai suddetti AA. I componenti del nostro terreno peraltro, sono di più facile ed economica reperibilità.

Tabella I - *Rendimento colturale (in ml) dopo 7 giorni dalla semina in popolazioni di Rh. axei allevate a diverse temperature. Valori medi con limiti fiduciari del 95% ($m \pm t_{0,05} \cdot s_m$) ed ampiezza del campo di variazione (a) di 15 replicazioni. In riquadro l'intervallo ottimale comprendente tutti i valori statisticamente non diversi dal valore massimo.*

Temperature (°C)	Rendimento colturale	
	$m \pm t_{0,05} \cdot s_m$	a
15	2,71 ± 0,18	2,3 — 3,3
18	4,92 ± 0,51	4,0 — 6,8
21	8,05 ± 0,41	7,2 — 9,5
24	6,77 ± 0,30	6,1 — 8,0
27	7,02 ± 0,47	6,2 — 8,8
30	6,71 ± 0,60	5,2 — 8,5
33	2,03 ± 0,28	1,5 — 3,0

La curva di crescita di *Rh. axei* è stata calcolata alla temperatura centrale (24 °C) dell'intervallo considerato. Le colture sono state interrotte quotidianamente dal 3° al 16° giorno della semina, facendo, per ciascun trattamento, cinque repliche e controllando ogni giorno il pH.

La tabella II riporta i risultati ottenuti. Da essa si evidenzia che il valore massimo è stato ottenuto al 6° giorno (7,60 ml); tale valore, confrontato col « t » di Student, è diverso da tutti gli altri, escluso quello relativo al 5° giorno dalla semina. Essa mostra anche come la produzione diminuisca sensibilmente, fino a dimezzarsi, a partire dal 13° giorno. Il pH dei terreni, prima della semina, è risultato pari a 8,5. Nei giorni immediatamente successivi, durante i quali i terreni sono stati spruzzati solo con acqua, esso è salito a valori intorno a 9,3. Successivamente è disceso, restando in ogni caso basico anche al 16° giorno, quando il rendimento colturale era già notevolmente diminuito. L'optimum del rendimento colturale è stato registrato a pH = 8,7.

Tabella II - *Rendimento colturale (in ml) e pH nel corso dell'esperimento a 24° C. Valori medi con limiti fiduciari del 95% ($m \pm t_{0,05} \cdot s_m$) e ampiezza del campo di variazione (a) di 5 replicazioni. In riquadro l'intervallo ottimale comprendente tutti i valori statisticamente non diversi dal valore massimo.*

Giorno dall'inizio dell'esperimento	Rendimento colturale		p H
	$m \pm t_{0,05} \cdot s_m$	a	
3°	3,98 \pm 0,44	3,5 — 4,3	8,3
4°	5,68 \pm 0,69	4,9 — 6,4	8,3
5°	7,54 \pm 0,47	7,0 — 8,1	8,7
6°	7,60 \pm 0,75	6,9 — 8,4	8,7
7°	6,77 \pm 0,30	6,1 — 8,0	9,0
8°	5,68 \pm 0,47	5,2 — 6,2	9,0
9°	5,68 \pm 0,44	5,3 — 6,0	9,3
10°	5,70 \pm 0,50	5,4 — 6,3	9,2
11°	5,46 \pm 0,42	5,1 — 6,0	8,9
12°	6,22 \pm 1,05	5,2 — 7,3	8,6
13°	3,52 \pm 0,39	3,2 — 4,0	8,6
14°	3,00 \pm 0,36	2,8 — 3,5	8,6
15°	2,28 \pm 0,42	1,9 — 2,7	8,6
16°	3,48 \pm 0,29	3,1 — 3,7	8,6

RIASSUNTO

È stato ricercato un nuovo terreno colturale non agarizzato saggiando alcuni componenti organici sia singolarmente sia in combinazione percentuale diversa con ognuno degli altri, fino ad ottenerne uno che a 21° C e dopo 7 giorni ha dato un elevato rendimento: circa 5 milioni di nematodi con un inoculo di 150.000 esemplari di *Rhabditis axei* (Cobbold, 1884). Tale terreno è costituito (in peso) dal 30% di sterco di vitello disseccato e macinato, 8% di farina di soja, 25% di semi di grano, 20% di crusca di frumento e 17% di farina d'erba medica. La curva di crescita di *Rh. axei*, studiata a 24° C, ha evidenziato che il migliore rendimento si ottiene dopo 5-6 giorni dalla semina. Nel corso di tale esperimento il pH dei terreni è rimasto costantemente basico, oscillando intorno a valori compresi tra 8,3 e 9,3.

SUMMARY

Growth curve of populations of *Rhabditis axei* (Nematoda: Rhabditidae) in a new cultural medium.

The best culture medium for the growth of *Rhabditis axei* (Cobbold, 1884) was found to be a mixture in weight of 30% dried and ground calf excrement, 8% soybean flour, 25% wheat seeds, 20% wheat bran and 17% alfalfa flour.

Making use of this medium and beginning with 150 thousand nematodes at 21° C, seven days after the inoculation, about 5 millions of individuals were obtained.

The growth curve of the nematode at 24° C indicated that the highest yield is obtained 5 to 6 days after inoculation. The medium was maintained at pH 8,3 to 9,3 throughout the experiment.

LAVORI CITATI

- DOUGHERTY E. C., 1960 - Cultivation of Aschelminths, especially rabditid nematodes. *Nematology*. Ed. Sasser & Jenkins, Univ. N. Carolina Press: 297-318.
- ITO Y., 1972 - The effects of nematode feeding on the predatory efficiency for house fly eggs and reproduction rate of *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Mesostigmata). *Jap. J. Sanit. Zool.*, 23: 209-213.
- NIGON V., 1949 - Les modalités de la reproduction et la déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. *Ann. Sci. Nat.* (b) ser, 11: 1-132.
- RODRIGUEZ J. G., WADE C. F. e WELLS C. N., 1962 - Nematodes as a natural food for *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae), a predator of the house fly egg. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 55: 507-511.
- SINGH P. e RODRIGUEZ J. G., 1966 - Food for macrochelid mites (Acarina) by an improved method for mass rearing of a nematode, *Rhabditella leptura*. *Acarologia*, 8: 549-550.
- THORNE G., 1961 - Principles of Nematology. New York: Mc Graw-Hill Book Company Inc, 553 pp.

Accettato per la pubblicazione il 5 marzo 1978.