

Metodi usati nella Stazione Zoologica per la conservazione degli animali marini

da

Salvatore Lo Bianco.

Vorbemerkung.

Die Veröffentlichung der Conservierungsmethoden, die seit Jahren in der Zoologischen Station gehandhabt werden, wird vielen Forschern sehr erwünscht sein. Bei dem zunehmenden Drange, auch die Ozeane in den Bereich der biologischen Untersuchungen zu ziehen, macht sich das Bedürfnis immer fühlbarer, die vielen neuen Formen in gut conservirter Verfassung nach Hause zu bringen; durch die weite Verbreitung aber, welche die Thierwelt des Golfes von Neapel in conservirter Gestalt gefunden hat, trat der Gegensatz der von uns angewandten Methoden gegenüber den bisher gebräuchlichen zu vielen Forschern vor die Augen, als dass nicht der Wunsch sich überall hätte regen sollen, die Methoden zum Gemeingut Aller gebracht zu sehen.

Man wird es dem Schreiber dieser Zeilen gewiss aufs Wort glauben, dass er den Vortheil der Wissenschaft ebenso gut begriff, wie Andere: ist es ihm doch vergönnt gewesen, der Biologie in ganz anderen Dimensionen förderlich zu werden, als durch neue Conservierungsmethoden. Wenn er sich trotzdem gegenüber den zahlreich an ihn ergehenden Bitten und Aufforderungen, die Methoden zu publiciren, ablehnend verhielt, so hatte er dazu triftige Gründe, und hätte wohl erwarten können, dass man ihm, auch ohne diese Gründe zu kennen, das Zutrauen schenkte, nicht nach Launen sondern nach vorbestimmten Gesichtspunkten zu handeln. Den Zeitpunkt der Veröffentlichung hatte er seit Jahren an den Eintritt eines anderen Er-

eignisses geknüpft: dasselbe ließ auf sich warten und so verschob sich auch die Publication der Methoden.

Im Januar 1889 erhielt ich endlich die Zusicherung, deren ich bedurfte, und sofort gab ich Herrn LO BIANCO den Auftrag, die Methoden in der Form schriftlich niederzulegen, in der sie jetzt erscheinen.

Mögen sie nun all die Vortheile bringen, die man sich davon verspricht.

Neapel, 11. April 1890.

ANTON DOHRN.

Prefazione.

Occupato da varii anni nella conservazione degli animali marini in questo istituto, ho cercato continuamente di migliorare la tecnica in modo da ottenere le forme per quanto più possibile nelle loro dimensioni e nell'aspetto che hanno allo stato vivente, sicchè possano conservarsi in alcool per un tempo relativamente lungo.

A ciò sono stato spinto dal vedere in quale miserevole stato e quanto diverso dal vero sono generalmente gli animali marini delle collezioni ad uso di studio, e di quelle che si tengono nei musei.

I primi felici risultati ottenuti, la gran quantità di materiale e le facilitazioni che mi sono state offerte continuamente dall'istituto stesso, mi hanno invogliato a perfezionare ed estendere sempre più i metodi che l'esperienza mi ha dimostrato opportuni.

Come è stato detto qui innanzi dal Professor DOHRN, per molto tempo ho dovuto avere una certa riserva nel comunicare i risultati a cui man mano arrivavo. Ciò non pertanto già da alcuni anni li comunico a varii ufficiali di marina, acciocchè possano giovarsene per fare nei loro viaggi collezioni zoologiche in condizioni utili per lo studio.

Già in alcune pubblicazioni si è parlato dei metodi usati nella Stazione Zoologica; ciò è stato fatto senza nessuna autorizzazione e a nostra insaputa, onde io non riconosco alcuna responsabilità delle cose ivi stampate.

I metodi che ora pubblico sono destinati principalmente a con-

servare l'aspetto generale degli animali che devono figurare nei musei o servire a dimostrazioni nei corsi; essi perciò non sono fatti per gli studii istologici, ma in molti casi la conservazione degli elementi si trova accoppiata a quella della forma del corpo.

Quantunque io abbia sperimentato soltanto sopra animali del nostro golfo, è chiaro che gli stessi metodi si possono applicare con risultati egualmente buoni alle forme affini di altri mari, e di ciò del resto se ne è avuto una pruova nelle varie collezioni fatte dagli ufficiali di marina.

Spero dunque che queste notizie sieno per riuscire utili a coloro che si occupano della conservazione, ma non ho in nessun modo la pretesa di aver raggiunto la perfezione e di aver esaurito un così vasto argomento: questo solo posso dire, ed è, che i metodi qui esposti sono quelli che in una lunga pratica mi hanno dato i migliori risultati e in molti casi hanno dei vantaggi indiscutibili sugli altri fin' ora usati.

Napoli. Marzo 1890.

A. Utensili e reattivi.

Vetri.

Gli animali preparati, cioè che hanno subito un trattamento preventivo con qualsiasi reattivo, vengono conservati definitivamente in alcool dentro vasi di vetro chiusi con tappi smerigliati o di sughero; la forma più conveniente e senza dubbio la più elegante è quella dei vasi cilindrici con piccola base e tappo smerigliato, piano superiormente. Essi servono, nelle volute dimensioni, meglio di ogni altro recipiente per conservare animali di qualunque forma con grande risparmio di liquido.

Siccome però i cilindri costano piuttosto caro, per gli usi comuni e per le manipolazioni si possono anche usare gli ordinarii boccali a collo basso e poco ristretto.

I piccoli boccali piuttosto bassi a tappo scavato internamente, con collo pochissimo ristretto si raccomandano per piccoli animali a forma globosa o molto schiacciata.

Di grande utilità sono i tubi con fondo arrotondato, orli arrotondati a fuoco, e pareti non molto spesse. Quelli di un calibro mag-

giore di 30 mm. devono avere gli orli leggermente arrovesciati in fuori, per potervi ben legare intorno un pezzo di vescica. Tutti indistintamente si chiudono con tappo di sughero; questo dev' essere piuttosto basso, cilindrico, in modo da combaciare perfettamente con la parete del tubo, e la sua faccia interna dev' essere spianata con un taglio netto, acciò non accada che si stacchino facilmente dei pezzetti di sughero e vadano ad imbrattare il liquido. Si badi bene a scegliere tappi ben compatti senza screpolature nè buchi.

Per conservare piccoli animali, uova, larve ecc. è utile mettere i tubicini che li contengono, turati con bambagia, in un vaso con alcool ben chiuso: così l'alcool dei tubicini non si evapora e rimane limpido, mentre i tappi di sughero a lungo andare, per l'acido tannico che si scioglierebbe, colorerebbero in bruno i preparati.

Per animali larghi e piatti, come Asteridi, Pleuronettidi e simili, si usano recipienti a faccie rettangolari, stretti, piuttosto alti, che si chiudono con una lamina di vetro mercè un mastice qualunque. Questi recipienti hanno il vantaggio di lasciar meglio osservare il preparato.

Per forme sottili, allungate e rigide, ad esempio *Funiculina*, uso tagliare, secondo la lunghezza necessaria, tubi di vetro da pipette, chiudendone un estremo alla fiamma e l'altro con un tappo di sughero.

Nelle manipolazioni preventive si usano molto i cristallizzatori che, avendo il fondo piano e le pareti basse, possono contenere in poco liquido molti esemplari senza che si tocchino o si pigino. Essi si prestano anche per tenervi animali viventi nell' acqua di mare, onde lasciarli in riposo, perchè si distendano, per poi ucciderli con metodi lenti o rapidi, e per indurirli nei differenti liquidi, finchè si trasportano in recipienti definitivi. Questi cristallizzatori hanno orli smerigliati, sicchè possono coprirsi con dischi di vetro.

Per indurire vermi o altri animali allungati abbiamo delle vaschette rettangolari coperte da una lamina di vetro.

S'intende che è necessario avere una quantità di bicchieri comuni senza piede, di diverse dimensioni, che possono servire per tenervi animali viventi; poi tubi di vetro per raccogliere piccoli animali, pipette a contagocce, bacchette di vetro, bottiglie a collo stretto per reattivi, imbuto di vetro di differenti grandezze, cilindri graduati ecc.

Utensili diversi.

Per conservare animali, e specialmente pesci, di una grandezza superiore ai recipienti di vetro che si sono menzionati, abbiamo fatto

costruire casse di zinco rettangolari con una piccola gronda al margine. Il coperchio è anche di zinco, con i margini ripiegati che si adattano nella gronda; s'impedisce l'evaporazione, riempiendo la gronda con acqua e uno strato di olio. Il coperchio ha un foro nel mezzo, che serve al passaggio dell'aria compressa nella chiusura e che vien turato dopo con un tappo. Però queste casse hanno l'inconveniente che lo zinco dopo un certo tempo vien corrosivo (probabilmente da sostanze acide che lo spirito scioglie dai tessuti animali). La cassa di metallo si rivestirà con una fodera esterna di legno per garantirla dagli urti.

Oltre le vaschette rettangolari di vetro, per indurire animali di forma allungata, abbiamo delle cassette rettangolari di zinco con uno strato di cera sul fondo, per fissare gli spilli destinati a mantenere distesi i preparati. Quando si usano liquidi che attaccano gli spilli metallici (acidi, sublimato ecc.) sarà utile adoperare aculei di *Eri-naceus* o di Cactee.

Per portare gli oggetti da un recipiente in un altro, onde cambiare il liquido, si usano delle spatule di diversa grandezza, preferibilmente di corno, giacchè non sono attaccate dai liquidi.

Una grande pinzetta di ferro o di ottone è comodissima per prendere animali da recipienti profondi. Si avranno ancora piccole pinzette, forbici, coltelli di diversa grandezza e siringhe.

Per affumicare Attinie uso il seguente apparecchio. All'estremità di un piccolo soffietto si adatta la bocca di una pipa metallica, riempita di tabacco acceso, il cui tubo curvato ad S s'intromette dov'è l'animale da narcotizzare col fumo.

Reattivi.

Il liquido più indispensabile senza dubbio è l'alcool. Quello rettificato, limpido e che si mescola con l'acqua distillata senza dare nessun precipitato è da preferirsi per la preparazione e conservazione degli animali delicati e trasparenti, mentre per le forme grosse si può usare alcool ordinario, oppure il risultato della ridistillazione di quello già usato che preventivamente si neutralizzerà, aggiungendovi calce se è acido, o acido muriatico se alcalino. Abbiamo sempre pronta una quantità di alcool a 70% che è quello usato ordinariamente per conservarvi gli animali: solo in alcuni casi speciali si prende quello a 90%. Prima di adoperare l'alcool debole, fatto al momento allungandolo con acqua, bisogna lasciarlo bene riposare, e ciò per evitare che l'aria contenuta nell'acqua, liberandosi in

piccole bollicine. si attacchi al preparato e, sollevandolo, lo schiacci contro la superficie del liquido.

Gli animali fissati con qualunque liquido si conservano dopo in alcool; per quelli molli o gelatinosi s'incomincia col lasciarli 2 a 6 ore in alcool a 35 o a 50 % secondo la maggiore o minore consistenza; poi o si trasportano in quello a 60 % o direttamente in quello a 70 %.

Quando le soverchie manipolazioni possano sciupare preparati, l'alcool si cambia togliendo una porzione di quello più debole in cui sono, e aggiungendovene del più forte fino al grado voluto; e per evitare ogni scossa questo cambiamento può farsi mediante sifoni.

Perchè gli animali si possano definitivamente conservare è mestieri che l'alcool a 70 % sia cambiato una volta dopo 12—24 ore, e se il pezzo è alquanto spesso un'altra volta dopo un paio di giorni.

Le forme di una certa consistenza s'immergono direttamente in alcool a 70 % che si cambia come abbiamo detto. Accade, talvolta, sebbene raramente, che anche dopo i necessari cambiamenti, l'alcool dopo qualche tempo ancora si colori; in tal caso diventa necessario cambiarlo di nuovo.

Quando in un recipiente si mettono animali che non ancora sono imbevuti di alcool, è necessario agitarlo ogni tanto, per evitare che si formi in prossimità del fondo uno strato di alcool molto debole nel quale gli animali potrebbero essere macerati.

Ho provato molti liquidi per poterli sostituire all'alcool, ma sempre ho avuti risultati cattivi. Alenni, come il liquido di GOADBY e quello di OWEN usati per il passato nella conservazione delle forme gelatinose, a lungo le riducono di grandezza e le sformano completamente. Il liquido di WICKERSHEIMER, a suo tempo tanto preconizzato, usato per gli animali marini, li deforma o li macera. L'alcool a 70 % è preferibile per conservare definitivamente gli animali, purchè essi ne siano sufficientemente imbevuti mercè reiterati cambiamenti; alcool più forte, non solo non è, nella maggioranza dei casi, necessario alla buona conservazione, ma riesce altresì dannoso, perchè a lungo indurisce troppo e rende fragili i pezzi.

L'alcool è utile anche per narcotizzare o uccidere lentamente o rapidamente.

Acido cromico. Dopo l'alcool questo acido in soluzione acquosa è un reattivo utilissimo, e serve specialmente per uccidere e indurire animali gelatinosi o molli. Essi però vi devono rimanere dentro giusto il tempo necessario, altrimenti si tingono troppo e diventano fragili. Bisogna poi, come bene si sa, lavare con acqua dolce

i pezzi, per evitare che essi posti nell'alcool producano precipitato e acquistino col tempo una tinta troppo verdastria. L'acido cromatico si adopera in miscele con l'acido osmico, acetico, picrico, con sublimato e raramente con l'alcool. Le soluzioni si possono fare in acqua comune ed eccezionalmente anche in quella di mare, ed è bene tenerle in luoghi freschi. Quelle che hanno servito una volta, possono essere usate ancora, se non sono state troppo diluite dall'acqua che contenevano gli animali, e non sia passato troppo tempo: del resto è facile accorgersi, se il liquido è alterato, dal cambiamento di colore che tende al verde.

Acido acetico. È un reattivo che ha il potere di penetrare istantaneamente nei tessuti e fissarli, ed è il mezzo più efficace per uccidere rapidamente gli animali contrattili, ma ha l'inconveniente di rammollirli se vi rimangono dentro molto tempo. Essi restano relativamente trasparenti. In certi casi è necessario usare l'acido in soluzioni concentrate, e spesso vien mescolato all'acido cromatico per uccidere e indurire animali trasparenti non contrattili.

Acido osmico. In generale ora non si usa più tanto come per lo passato, giacchè presenta varii inconvenienti. Io mi sono studiato di sostituirlo con altri reattivi, ed in molti casi vi sono riuscito perfettamente. Indurisce bene le forme gelatinose e ne conserva sufficientemente la trasparenza, ma se la sua azione dura troppo a lungo, esso annerisce molto i preparati e li rende fragili; perciò questi debbono rimanervi soltanto finchè abbiano acquistato una leggiera tinta bruna¹. Prima di passarli in alcool si lavano per alcuni minuti in acqua dolce o distillata, e lo stesso si fa per quelli trattati con qualunque miscela contenente osmio.

Il liquido di KLEINENBERG² è stato tra i primi adoperati in questa Stazione per la conservazione delle forme marine. L'inconveniente che esso presenta d'ingiallire l'alcool anche dopo reiterati lavaggi, e di non indurire sufficientemente, lo ha fatto a poco a poco abbandonare, tanto che adesso si usa molto di rado e quasi solamente a scopi istologici.

¹ Il metodo di PAUL MAYER per scolorare i pezzi troppo anneriti (vedi Mitth. Z. Stat. Neapel 2. Bd. 1880 pag. 8) non è adottabile per gli animali molli i quali verrebbero ammolliati di troppo.

² Il liquido di KLEINENBERG si fa nella maniera seguente: Si mescolano 100 c. c. di una soluzione acquosa concentrata di acido picrico con 2 c. c. di acido solforico conc.; al liquido filtrato si aggiunge 3 volte il proprio volume di acqua distillata.

Acido lattico. In soluzione all' 1⁰⁰/₀₀ in acqua di mare serve anche bene a fissare larve e piccoli organismi gelatinosi.

Gli acidi muriatico, nitrico, pirolignoso e solforico sono usati raramente.

Sublimato corrosivo. Raccomandato da A. LANG, si adopera moltissimo come fissatore, perchè ha la proprietà di penetrare presto e d'indurire molto; si usa in soluzioni concentrate sia in acqua dolce, come in acqua di mare, a freddo e a caldo. Nelle manipolazioni col sublimato non si useranno strumenti di metallo, giacchè essi decompongono la soluzione, si sciupano e guastano i preparati. Le soluzioni si possono anche fare a caldo, per economia di tempo, in recipienti di vetro o di porcellana; si abbia la precauzione di evitare l'ebollizione in recipienti aperti, di non respirarne i vapori, e di non imbrattarsi le mani se vi sono screpolature o ferite aperte.

Quasi tutti gli animali preparati con questo reattivo possono servire anche per ricerche di istologia. Spesso si usa anche in miscele con acido acetico, cromico, e con solfato di rame.

Gli animali fissati col sublimato, dopo il lavaggio nell' acqua dolce, devono rimanere, secondo è stato indicato da P. MAYER, nell'alcool iodato, finchè non lo scolorino più anche rimanendovi per qualche tempo: senza di che il preparato diviene fragile e in esso si forma un precipitato nero contenente mercurio; talvolta si anneriscono anche le pareti interne del recipiente.

Bicromato di potassio. Si adopera in soluzioni al 5⁰/₀ per indurire lentamente alcuni animali gelatinosi senza renderli troppo fragili, il che non si può ottenere con l'acido cromico. Per l'abbondante precipitato che danno, allorchè si passano in alcool, gli oggetti trattati col bicromato, l'uso di questo reattivo non è da raccomandarsi. Per scolorare i preparati che già si trovano in alcool, aggiungo a questo alcune gocce di acido solforico concentrato.

Solfato di rame. Se ne usano soluzioni del 5 al 10⁰/₀, fatte a caldo in acqua dolce, e serve solo o mescolato al sublimato per uccidere larve ed animali delicati. Gli oggetti trattati con questo reattivo devono poi lavarsi ripetutamente con acqua, finchè questa non rimanga perfettamente limpida, altrimenti si formano nei tessuti dei cristalli che li rendono opachi. Si può fare a meno del lavaggio, quando i pezzi devono essere successivamente trattati con un acido.

Idrato di cloralio. In soluzioni debolissime, all' 1 o 2⁰⁰/₀₀, fatte di fresco in acqua di mare, lo usiamo per narcotizzare diversi

animali prima di fissarli¹. Questo metodo ha il vantaggio che, se l'animale dopo un certo tempo non rimane nelle condizioni volute per essere preparato, si può rimettere in acqua di mare, ove ripiglierà i movimenti e continuerà a vivere. Si adopera pure per far uscire, onde poi prepararli, animali che vivono nelle pietre, nelle incrostazioni di alghe calcaree, nelle colonie di Serpule e di Madre-pore, i quali vi si lasciano dentro da 6—12 ore.

Oltre i citati reattivi si avranno in piccole quantità cloroformio, etere e tintura alcoolica di iodo.

Miscele più adoperate.

Alcool e acido cromatico:	{ Alcool a 70 % Acido cromatico 1 % }	parti uguali.
Alcool cloridrico:	{ Alcool a 50 % Acido muriatico conc. }	100 c. c. 5 c. c.
Alcool iodato:	{ Alcool a 35 % o a 70 % Tintura alcoolica di iodo }	100 c. c. 2,5 c. c.
Acqua marina alcoolizzata:	{ Acqua di mare Alcool assoluto }	100 c. c. 5 c. c.
Miscela cromo-acetica Nr. 1:	{ Acido cromatico all' 1 % » acetico conc. }	100 c. c. 5 c. c.
» cromo-acetica No. 2:	{ Acido acetico conc. » cromatico all' 1 % }	100 c. c. 10 c. c.
» cromo-osmica:	{ Acido cromatico all' 1 % » osmico all' 1 % }	100 c. c. 2 c. c.
» cromo-pierica:	{ Acido cromatico all' 1 % Liquido di KLEINENBERG }	parti uguali.
» di rame e sublimato:	{ Solfato di rame al 10 % Sublimato in soluzione satura }	100 c. c. 10 c. c.
» di bicromato di potassio e acido osmico:	{ Bicromato di potassio al 5 % Acido osmico all' 1 % }	100 c. c. 2 c. c.
» di sublimato e acido acetico:	{ Sublimato soluz. conc. Acido acetico conc. }	100 c. c. 50 c. c.
» di sublimato e acido cromatico:	{ Sublimato soluz. conc. Acido cromatico all' 1 % }	100 c. c. 50 c. c.

¹ È inutile servirsi di una qualità fina.

B. Metodi di preparazione e conservazione.

Protozoa.

Essendo i Protozoi animali molto piccoli e per la maggior parte invisibili ad occhio nudo, la loro preparazione rientra nel campo microscopico, perciò mi sono occupato solamente delle specie più grandi. Alcune Gregarine che si trovano parassite nel nucleo intestinale della *Salpa maxima africana* sono ben riuscite col liquido di KLEINENBERG. lasciandovele dentro per quasi un' ora prima di trasportarle in alcool debole.

Radiolaria.

La *Thalassicolla* si fissa bene in acido cromico al $\frac{1}{2}\%$, ove si lascia circa un' ora e poi gradatamente si trasporta in alcool a 70% .

Le Aulacanthidae e le Acanthometrae si mettono direttamente in alcool a 50% e dopo poche ore si passano in quello a 70% . Buone preparazioni si hanno anche, aggiungendo all' acqua di mare che contiene gli animali, qualche goccia di acido osmico all' 1% , e poi lavandoli in acqua dolce prima di passarli in alcool. Di alcune specie fissate insieme ad altri piccoli organismi pelagici in una soluzione concentrata di sublimato in acqua di mare ottenni buonissimi preparati microscopici.

Sphaerzoidae¹. Le diverse specie del genere *Sphaerzoum* e *Collozoum* che hanno forma sferica o cilindrica si fissano in alcool a 35% iodato, lasciandovele dentro da 15 minuti ad un ora circa ed avendo cura di agitare il liquido, perchè rimanendo troppo tempo sul fondo del recipiente gli animali si appiattiscono. Volendone preparare una gran quantità in una sol volta è necessario mettere il liquido fissatore in un cristallizzatore ampio, perchè esse non si comprimano a vicenda. Dopo il tempo stabilito si passano in alcool a 35% , ove rimangono un paio d'ore; il cambiamento si può fare trasportando con una spatula le colonie in un altro cristallizzatore della stessa grandezza oppure togliendo lentamente l'alcool iodato e sostituendovi l'alcool a 35% , però senza mai lasciarle senza liquido. Nella stessa maniera si passano in alcool a 50% e dopo 12 ore in quello a 70% che vien rinnovato dopo 24 ore. In questo modo si ottengono preparati incolori che possono servire anche per ricerche

¹ Questi metodi sono stati descritti da K. BRANDT a pag. 7—11 della sua monografia: Die koloniebildenden Radiolarien (Sphaerzooen) des Golfes von Neapel. in: Fauna Flora Golf. Neapel. 13. Monogr. 1855.

istologiche. Non è da raccomandarsi l'acido osmico, perchè si anneriscono di troppo.

Nelle colonie di *Sphaerozoum* con formazioni isosporiche la forma non si fissa coll' alcool iodato, invece bisogna adoperare il sublimato concentrato. I generi *Myxosphaera*, *Acrosphaera* e *Collosphaera* si uccidono in acido cromico all' 1 %, usando la stessa forma di recipiente e le medesime precauzioni dette per il *Collozoum*. Vi si lasciano da $\frac{1}{2}$ —1 ora, dopo di che, versando via l'acido, vi si sostituisce dell' acqua dolce per lavarle, ma in maniera che le colonie galleggino nel liquido, giacchè altrimenti si rompono: allo stesso modo si passano gradatamente in alcool.

Acinetidae. La *Trichophrya salparum* ha dato belle preparazioni microscopiche col sublimato conc. in acqua di mare. Invece con l'*Acineta foetida*, che vive comune sugli idroidi, si sono avuti migliori risultati con l'acido osmico.

Vorticellidae. Le colonie di *Zoothamnium* si uccidono meglio con il sublimato conc. bollente.

Porifera.

Per le spugne che devono servire a scopo di collezione basta l'immersione diretta nell' alcool a 70 %, rinnovandolo come si è detto a pag. 440.

Per evitare la contrazione nelle *Halisarcidae* le fisso o in acido cromico all' 1 %, lasciandovele mezz' ora, o in sublimato conc. per 15 minuti. Le spugne che dovranno servire per lo studio, se non sono troppo voluminose, cioè se non hanno uno spessore maggiore dei 10 cm., s'immergono in alcool a 90 % o assoluto, rinnovandolo una volta dopo 3 o 4 ore ed una seconda dopo 24—48 ore; se invece più grandi, si tagliano in piccoli pezzi con un coltello ben affilato e si trattano nella stessa maniera.

Per farle seccare si laveranno prima in acqua dolce per un paio d'ore, dopo si lasceranno una giornata in alcool ordinario e poi all'aria o al sole: così non avranno cattivo odore. Se si vuol mantenere per diversi giorni il colore rosso di alcune spugne (*Suberites*, *Axinella*) basta metterle in alcool a 40 % senza cambiarlo.

Anthozoa.

La prima cosa da farsi, quando si è pescato un Antozooario, è di metterlo in un recipiente con acqua fresca di mare. Succede sempre che gli animali, disturbati o dall' apparecchio di pesca o dal trasporto, si contraggono o si ritirano completamente; per farli espan-

dere, o basta il lasciarli in un vaso con acqua di mare limpida, oppure è necessario tenerli per un tempo più o meno lungo in acqua corrente. Spesse volte ho osservato che si aprono solamente dopo alcuni giorni di permanenza nella stessa acqua, quando questa già incomincia a decomporsi.

I seguenti metodi, specialmente quelli con la miscela cromo-acetica no. 2, servono a conservare gli animali per musci, ed al più per ricerche di anatomia grossa.

Quasi tutti gli *Alcionarii*, contenendo piccoli spicoli calcarei che sono caratteri specifici, devono rimanere nella miscela acida il minor tempo possibile, affinchè l'acido non attacchi gli spicoli.

Nei casi in cui la miscela cromo-acetica no. 2 non dà buoni risultati, potrà provarsi invece il miscuglio di sublimato ed acido acetico, ma sempre per la sola uccisione, trasportando poi gli animali rapidamente in alcool debole.

Un metodo usato da G. v. KOCH è l'immersione rapida degli animali distesi in alcool a 90 % o assoluto, iniettandone dopo anche nell'interno della colonia.

Appena le colonie di *Cornularia*, *Clavularia*, *Rhizoxenia* e *Symphodium* sono espanse, con un piccolo sifone si fa uscire tutta l'acqua di mare che è nel recipiente, lasciandovene tanta quanto basta a coprire la colonia. Questa operazione dev'essere fatta con molta attenzione, onde evitare qualunque scotimento che possa far contrarre i polipi: perciò si mette nel bicchiere il sifone già pieno di acqua, tenendone chiusa l'apertura inferiore con un dito, per poterne regolare l'efflusso. Poi si versa rapidamente nel recipiente un volume di miscela cromo-acetica no. 2 doppio di quello dell'acqua in cui sono gli animali, che immediatamente dopo si trasportano in alcool a 35% o 50%, imprimendo al preparato qualche leggiera scossa che spesso riesce utile per far distendere meglio i tentacoli. Un'altro metodo buono è l'uccisione con il sublimato conc. caldo, usato nelle stesse proporzioni della miscela cromo-acetica, lavando gli animali, non appena morti, in acqua dolce.

I grandi *Alcyonium* si possono anche uccidere in un'altra maniera, cioè immergendoli rapidamente nell'acido cromo-acetico no. 2 e sospendendoli, appena morti, in un vaso contenente alcool debole in modo che i polipi non tocchino le pareti; e se i polipi sono rimasti bene distesi, il cambiamento nei diversi alcool si farà molto gradatamente. Spesso succede che nell'alcool debole si formano aderenti ai polipi delle bollicine d'aria che per la loro tendenza a salire premono quelli

tanto da sfomarli: ciò si può evitare dando dei piccoli colpi al recipiente.

Pennatula phosphorea e *Kophobelemnon*. Gli animali espansi si prendono per la base nuda e molto rapidamente s'immergono in un cilindro profondo che contiene la miscela cromo-acetica no. 2; dopo alcuni secondi si mettono in un cristallizzatore con alcool a 50 %, ove si dispongono con il dorso sul fondo. Indi con una piccola siringa a canula molto sottile s'inietta dell' alcool a 70 % da un piccolo foro che si pratica nell' estremo della base; così l'alcool entra nei polipi, li gonfia e ne distende i tentacoli; e per evitare che l'alcool esca, si fa una legatura. Dopo alcune ore si trasportano in alcool a 70 % e nei recipienti definitivi il *Koph.* si sospende capovolto ad un galleggiante di vetro.

Pennatula rubra, *Pteroides spinulosus*, *Veretillum*, *Funiculina*. Si uccidono come i Pennatulidi precedenti, ma dopo si trasportano in alcool debole senza operare l'iniezione. Le forme molli, come *Ver.*, dovranno sospendersi nel recipiente definitivo.

I piccoli esemplari di Pennatulidi si possono uccidere senza toglierli dal bicchiere, ove si sono distesi, e operando come per le Cornularie.

Le ramificazioni piuttosto grandi di *Gorgonia*, *Gorgonella*, *Primoa*, *Muricea*, *Isis* ecc. debbono uccidersi con la miscela cromo-acetica no. 2 nello stesso recipiente dove si sono distese, a causa della grande sensibilità dei loro polipi. Si raccomanda sempre di lasciare nel momento dell' uccisione gli animali nella minor quantità possibile di acqua, e di versarvi su un volume della miscela doppio di quello dell' acqua in cui sono. Ho potuto diverse volte osservare che i Gorgonidi che si espandono nell' acqua di mare che incomincia a decomporsi, sono quelli che si fissano meglio.

Le piccole colonie o pezzi di colonie rimangono con i polipi distesi, se si uccidono con il sublimato conc. bollente.

L'*Isis* si conserva molto bene anche con il miscuglio di sublimato e acido acetico.

Corallium rubrum. Espansione in acqua di mare corrente, uccisione con sublimato conc. bollente (metà volume dell' acqua di mare), e subito dopo trasporto in alcool debole. Con questo metodo il colore si conserva perfettamente, mentre che colla miscela cromo-acetica si sbiadisce di molto. L'alcool che ha servito per la manipolazione del *C.* è bene che non si usi per la preparazione di animali delicati. (Una colonia di *Antipathes* messa in detto alcool dopo 24 ore era tutta colorata in rosso.)

Zoantharia. Tutte le specie di *Antipathes* si fissano con il sublimato conc., e per la poca contrattilità dei polipi, la loro preparazione riesce sempre. Il sublimato conc., usato a freddo, deve rappresentare lo stesso volume dell' acqua in cui sono contenuti i polipi.

Actiniaria. La preparazione di questo gruppo presenta molte difficoltà; la grande contrattilità e la resistenza del sistema muscolare della maggior parte delle specie costituiscono spesso per il preparatore un ostacolo insormontabile. Il più delle volte, mentre già si crede che l'animale sia fissato e privo di qualunque sensibilità, basta l'immersione in un reattivo ad azione rapida per vederne contrarre subito i tentacoli e tutto il corpo divenire irreconoscibile.

Di alcune forme per esempio, trattando varii esemplari con lo stesso metodo e nelle stesse condizioni, una porzione muore distesa e gli altri contratti; e la buona riuscita dipende in alcuni casi da ragioni che per ora ci sono del tutto ignote. Con tutto ciò, se si usa grande attenzione, almeno per molte specie, si arriva a conservarle perfettamente.

L'Anemonia sulcata (*Anthea cereus*) è la più facile a preparare. Bene distesa sotto l'acqua corrente, si uccide con la miscela cromopierica (in volume uguale, all' acqua in cui si trova), versando questa rapidamente nel recipiente che contiene l'attinia, dopo di averne tolta tanta acqua quanto è possibile, rimanendo l'animale immerso. Dopo 5 o 10 minuti, quando l'animale è morto, la sua base si stacca dalla parete dov' era fissata, e allora si trasporta in un altro recipiente con acido cromatico ad $\frac{1}{2}\%$, ove si capovolge, sospendendolo per il margine della base con uno o più uncini, e cercando con leggerezza di dare ai tentacoli la loro disposizione naturale. Passata una mezz'ora, si mette in alcool debole, ed è bene che nel recipiente definitivo l'animale si lasci galleggiare capovolto, cosa però inutile per i piccoli esemplari.

Per le seguenti attinie uso l'uccisione col sublimato conc. bollente: *Eloactis*, *Sagartia Dohrnii*, *Paranthus*, *Corynaetis* e piccoli esemplari di *Aiptasia*: prima di trasportarle in alcool le lascio indurire per alcuni minuti in acido cromatico al $\frac{1}{2}\%$.

Quando l'*Heliactis bellis*, il *Bunodes gemmaceus* e il *B. rigidus* sono bene distesi, si tolgono dal bicchiere $\frac{2}{3}$ dell' acqua di mare e vi si sostituisce idrato di cloradio al $\frac{200}{100}$. Dopo un paio di minuti si toglie di nuovo il liquido, lasciandovi appena quello che serve a coprire gli animali. e si uccidono versandovi sublimato conc. freddo.

L'*Adamsia Rondeletii* si narcotizza col fumo di tabacco¹ nella maniera seguente.

Dalla conchiglia dove sono fissate le Adamsie si cava fuori il Paguro, per evitare che disturbi le attinie; poi si sospende la conchiglia per mezzo di un filo ad una assicella di legno che poggia sugli orli di un bicchiere con acqua di mare, abbastanza ampio da contenere le attinie in perfetta espansione, senza che i loro tentacoli tocchino le pareti. Di questi bicchieri si mettono tanti quanti ne entrano in un cristallizzatore molto largo (oppure in un gran piatto a pareti basse) riempito a metà d'acqua, e si ricuoprono con una campana di vetro, la quale si fa pescare nell'acqua del cristallizzatore. Coll'apparecchio descritto a pag. 439 s'incomincia a riempire con fumo di tabacco (che dev'essere di qualità molto forte) lo spazio vuoto compreso nella campana, e si sospende l'operazione solamente quando questo è pieno di una nebbia di fumo denso che impedisce di vedere attraverso. Per fare uscire dalla campana l'aria entrata col fumo, prima d'incominciare l'affumigazione si mette un tubo di vetro piegato a U con un'apertura dentro lo spazio chiuso, e l'altra fuori.

Per regolare la durata dell'operazione è necessario che si faccia la prima affumigazione verso le ore 2 p. m. A poco a poco si vedrà il fumo dileguarsi, l'acqua incominciare ad assorbire le sostanze narcotiche contenute in esso, e gli animali per la maggior parte distendere la corona dei tentacoli. Verso le 5 p. m. si fa la seconda affumigazione simile alla prima e si lascia il tutto durante la notte. La mattina seguente si toglie con cautela la campana di vetro e con un ago si toccano i tentacoli, per sapere in quale stato di sensibilità si trovano; se sotto lo stimolo non si contraggono, si pone tra i bicchieri un cilindretto aperto contenente alcuni cent. cubici di cloroformio e si rimette la campana, per lasciare agire per 2 o 3 ore i vapori del cloroformio. Finalmente gli animali si uccidono con la miscela cromo-acetica Nr. 2, s'induriscono con acido cromico $\frac{1}{2}\%$ e indi in alcool, facendoli rimanere sospesi. Se invece i tentacoli danno ancora segni di sensibilità, si farà una terza affumigazione e dopo un paio d'ore gli animali si tratteranno nella maniera detta. Solamente così ho potuto ottenere dei bellissimi esemplari

¹ I fratelli HERTWIG che pubblicarono questo metodo l'hanno veduto nel laboratorio della Stazione Zoologica, come essi stessi dicono (vedi Jena. Zeit. Naturw. 13. Bd. 1879 pag. 467).

con la colonna bene distesa e con il disco e i tentacoli in piena espansione.

L'*Adamsia palliata* si può trattare nello stesso modo senza sospendere la conchiglia; ho avuto buoni risultati, narcotizzando lentamente l'animale con acqua di mare alcoolizzata e poi uccidendolo con la miscela cromo-acetica Nr. 2, o col sublimato conc. caldo.

La *Cladactis*, la *Cereactis* e la piccola *Bunodeopsis strumosa* si fanno morire con la miscela cromo-acetica Nr. 2 e subito dopo s'induriscono in acido cromico all' 1%, sospendendole con un uncino di vetro che s'infigge nel margine della base, e capovolgendole nei liquidi indurenti e conservatori. Ciò non è necessario per la *Bunodeopsis*. Per le due prime forme è utile che gli esemplari siano completamente sani, cioè che non vi siano lesioni o rotture, altrimenti, nel trasportarli in alcool, il liquido contenuto nel corpo dell' animale esce e questo resta raggrinzito. I grandi *Cerianthus* si fissano con l'acido acetico conc. e subito dopo, legandoli con un filo attorno alla colonna verso la base, si sospendono in alcool debole e con qualche leggera scossa si cerca di aggiustare i tentacoli: per i piccoli è inutile la sospensione.

L'*Actinia equina* e l'*A. Cari* si trattano con la miscela bollente di sublimato e acido acetico, seguita dall' acido cromico ad $\frac{1}{2}\%$ per l'indurimento. Spesso ho potuto conservare la prima specie, sollevandola delicatamente dal bicchiere in cui era espansa con una spatula, e immergendola in una soluzione concentrata di sublimato.

L'*Edwardsia* si narcotizza lentamente, versando a poco a poco dell' alcool a 70% nell' acqua di mare in cui si trova, e si uccide dopo con sublimato conc. caldo. La buona riuscita dipende dalla completa perdita di sensibilità, cosa che si può verificare toccando i tentacoli con uno spillo.

Difficilissima è la preparazione di alcune specie di *Polythoa*; con i reattivi ad azione rapida si ha almeno la colonna estesa e talvolta una porzione dei tentacoli fuori del disco. Una *Polythoa* che vive sulle spugne e sulle alghe calcaree (probabilmente una varietà della *P. axinellae*) si prepara molto bene con il sublimato conc. bollente.

Le larve di Attinie si uccidono con il sublimato conc., o con la miscela cromo-acetica Nr. 2.

Madreporaria. L'*Astroides calycularis* si lascia tutta una notte in bicchieri ripieni con acqua di mare limpida; ordinaria-

mente al mattino seguente si trovano i polipi in piena espansione; allora, tolta una porzione dell' acqua, senza che però gli animali restino allo scoperto, si uccidono con una soluzione bollente di sublimato e acido acetico in volume eguale a quello dell' acqua di mare. Immediatamente dopo si trasporta la colonia in alcool a 35% di cui si farà una iniezione nelle bocche dei polipi, per mantenerli distesi; in seguito si aumenta gradatamente la forza dell' alcool e, ripetendo le iniezioni, si portano finalmente in alcool a 70%, ove si laveranno bene colla tintura di iodio.

Le *Caryophyllia*, *Dendrophyllia* e *Cladocora* si fissano col sublimato conc. bollente, ma è difficile molto il prepararle con i polipi in perfetta espansione, e ciò tanto per la loro grande contrattilità come per la somma delicatezza delle pareti del corpo.

Hydromedusae.

Le Idromeduse in generale sono forme delicatissime che facilmente muoiono e si decompongono, perciò è necessario che si proceda alla loro preparazione al più presto possibile dopo che sono state pescate.

Specialmente alcune Campanularidae, come ad esempio *Aglaophenia*, *Plumularia*, *Sertularia* e forme simili, che vivono in acque profonde, arrivano in laboratorio quasi sempre rovinate o morte, e, più facilmente di altre forme, sciupate dalla draga, dalle reti di fondo o dagli altri ordegni di pesca. La miglior cosa che si possa fare di questi esemplari è di metterli direttamente in alcool per conservare almeno il perisarco.

Altre forme che vivono a poca profondità e che si possono pescare, usando tutte le precauzioni per non maltrattarle, hanno bisogno di essere manipolate subito, altrimenti dopo non molto tempo i polipi si ritirano e non è più possibile di farli uscire dalle loro cellette. In generale queste forme sono più contrattili delle Tubularidae.

Tutti gli Hydroidea, cioè a dire le forme polipoidi fisse, salvo rarissime eccezioni, si uccidono con il sublimato conc. caldo, beninteso mentre che i polipi si trovano in completa espansione, la quale si ottiene mettendoli, appena ricevuti, in bicchieri con acqua di mare fresca. Subito dopo che si è versato il liquido fissatore sugli animali, il tutto si versa in un cristallizzatore, ove già vi è dell' acqua dolce. per raffreddarlo, indi gli animali si trasportano in acqua dolce pura per il lavaggio e dopo 5 minuti in alcool debole.

Se si vuol evitare il riscaldamento, si può usare il sublimato conc. freddo, ma ciò solamente per le Tubularidae.

Per le grandi colonie di *Tubularia* e *Pennaria* l'uccisione può farsi con il miscuglio di sublimato e acido cromico in volume eguale a quello dell' acqua che contiene i polipi; dopo pochi minuti si passano in alcool.

Meduse di Tubularidae. Le piccole forme di *Eleutheria* (*Clavatella*), *Cladonema*, *Podocoryne* e simili vengono uccise con il miscuglio di sublimato e acido acetico usato in grande quantità: l'E. si fissa anche bene col liquido di KLEINENBERG.

La *Lizzia Koellikerii* e l'*Oceania pileata*, appena hanno disteso bene i tentacoli, si uccidono con l'acido acetico conc. e subito dopo si fanno cadere in un tubo che contiene il miscuglio di alcool e acido cromico; agitando lentamente il liquido, l'animale riacquista la forma; nel miscuglio resteranno un 15 minuti, indi si mettono in alcool a 35% che a poco a poco si porta a 70%. Invece del miscuglio di alcool e acido cromico, si può prendere come liquido induriente quello cromo-osmico, ma gli animali non rimangono così trasparenti ed i tentacoli si contraggono alquanto.

L'indurimento, soprattutto se le meduse da prepararsi sono molte, si farà tenendo il tubo in posizione orizzontale in maniera che l'ombrello capovolta poggi sulla parete laterale del tubo e che gli individui non si tocchino fra loro. Per la conservazione definitiva di alcune meduse (*Lizzia*), uso metterne una sola in un piccolo tubo con alcool, turato con bambagia (v. sopra pag. 438).

L'*Oceania conica* e la *Tiara pileata*, prima di trattarle come la *Lizzia* ecc., si narcotizzano in acqua di mare alcoolizzata al 3%.

Meduse di Campanularidae. *Eucope*, *Gastroblasta* ed *Obe-
lia* si fissano con la miscela di solfato di rame e sublimato, dopo un paio di minuti si lavano in acqua dolce, finché sparisca ogni traccia di precipitato.

Mitrocoma ed *Aequorea* si uccidono con acido acetico e immediatamente dopo si trasportano nel miscuglio cromo-osmico, ove si lasciano da 15 a 30 minuti secondo la grandezza dell' animale. Le piccole *Aequorea* si possono fissare direttamente con la miscela cromo-osmica.

La *Tima flavilabris* si uccide con acido cromico al 5% che si versa in volume eguale a quello dell' acqua che contiene l'animale; dopo 5 minuti si mette nella miscela cromo-osmica, ove resta almeno

una mezz' ora, indi si lava bene in acqua dolce, e si trasporta gradatamente in alcool.

Olindias Müllerii. Si fissa con l'acido acetico, immediatamente si passa in acido cromico all' 1^o/₀, ove con una pinzetta si distendono i tentacoli marginali.

Trachymedusae: *Rhopalonema*, *Cunina*, *Aegineta*, *Aeginopsis*, *Liriope* e *Carmarina*. Si fissano col liquido cromo-osmico per 5—20 minuti secondo la grandezza, poi si lavano in acqua dolce e si passano gradatamente in alcool. La *Cunina* talvolta riesce meglio, uccidendola coll' acido acetico conc. e indurendola dopo colla miscela cromo-osmica.

Per impedire l'appiattimento della campana nelle grandi idromeduse (*Carmarina*, *Tima*) è necessario mettere sul fondo del recipiente dove s'induriscono un vetro d'orologio concavo, in cui si farà poggiare la medusa capovolta.

Acalephae.

La *Charybdaea* si fissa rapidamente con la miscela cromo-acetica Nr. 2, e subito dopo si tratta con acido cromico a 1/2^o/₀; dopo una mezz' ora, quando si trasporta in alcool, si abbia cura di sospenderla per i tentacoli.

La *Nausithoe*, l'ephyra di *Pelagia*, e la *Rhizostoma* si uccidono aggiungendo all' acqua di mare in cui nuotano il 3^o/₀ di una soluzione d'acido osmico all' 1^o/₀, e non appena incominciano a prendere una leggera tinta bruna si lavano in acqua dolce per un paio di minuti e si mettono in alcool a 35^o/₀. Per evitare l'appiattimento dell' ombrella della *R.*, questa si ucciderà in un boccale a collo leggermente ristretto, e quando l'animale si trova in alcool, si leva il tappo e si chiude l'apertura con una vescica, così che, capovolgendo il boccale con la medusa, il margine dell' ombrella pogerà sugli orli del collo del recipiente, mentre la parte convessa resterà libera nel collo. La medusa rimarrà in questa posizione, finchè l'alcool non si è portato a 70^o/₀ e tutto il suo corpo non si è impregnato di questo liquido.

Pelagia noctiluca. Si lascia in liquido cromo-osmico per quasi un'ora, dopo si lava con acqua dolce, quivi si lega un filo attorno all'estremo di ciascun tentacolo senza sciuparlo, e quando l'animale è passato in alcool debole, si sospende in modo che la campana non tocchi il fondo piano del recipiente; in questa maniera resta, finchè non è indurita completamente.

Cotylorhiza tuberculata (*Cassiopeia*). Si fissa con l'acido osmico

come la *Rhizostoma*, e non appena incomincia a prendere la leggera tinta bruna, il liquido si sostituisce con bicromato di potassio al 5% che sarà rinnovato dopo un paio di giorni; l'animale in questo reattivo deve rimanere almeno due settimane, ma può lasciarvisi più tempo senza danno. Indi l'alcool a 35% sostituirà il bicromato, e siccome si sono depositati moltissimi cristalli nei tessuti dell'animale e oltre a ciò si è formato un grande precipitato al fondo del recipiente, è necessario rinnovare spesso l'alcool a cui si può aggiungere sul principio qualche goccia di acido solforico concentrato.

Le larve di *Acalephae* (*Scyphistoma*, *Strobila*) si uccidono con sublimato concentrato caldo: la *Strobila* si fissa anche bene con una miscela di acido acetico conc. (9 parti) ed acido osmico 1% (1 parte); immediatamente dopo si lava con acqua dolce.

Siphonophora.

Come per le Idromeduse, la preparazione si farà subito dopo la pesca, e si sceglieranno gli esemplari che sono in buone condizioni vitali. Specialmente per le Physophoridae, basta talvolta la permanenza di un paio d'ore nello stesso recipiente in cui l'acqua ha subito un cambiamento di temperatura, perchè tutta la colonia vada in pezzi, oppure divenga così fragile da spezzarsi, non appena venga a contatto con il liquido fissatore. Molta cura anche si deve avere nel pulire rigorosamente i recipienti che conterranno gli animali prima della loro uccisione: ho potuto osservare spesse volte che basta una leggera traccia di un acido o di un altro reattivo per dissociare tutta la colonia.

L'*Athorybia rosacea*, unico rappresentante della famiglia delle Athorybiadae, che si trova nel nostro golfo, è molto rara, e solamente con un esemplare ho potuto provare la preparazione, uccidendolo con il miscuglio di solfato di rame e sublimato: l'animale subì qualche contrazione, ma restò intero: lo lavai con acqua dolce e poi lo immerso in alcool.

Per le specie molto delicate (Physophoridae, Agalmidae ecc.) è bene di non versare direttamente gli animali, coll'acqua, dal recipiente in cui sono stati pescati nel cristallizzatore, dove si dovranno uccidere, ma di farveli passare con somma cautela, immergendo i due recipienti sott'acqua in una vasca. Nel cristallizzatore si lascerà la quantità d'acqua sufficiente, perchè l'animale galleggi, e si aspetterà qualche momento per dargli il tempo di distendere bene i polipi ed i filamenti pescatori.

I generi *Physophora*, *Agalma*, *Halistemma*, *Forskalia* si uccidono con la miscela di solfato di rame e sublimato¹ in volume eguale o doppio di quello dell' acqua di mare che contiene il cristallizzatore; la miscela dev' essere versata rapidamente e non sopra l'animale, il quale dopo pochi minuti, quando già è morto, con una larga spatola di corno si trasporta nel liquido induriente, che però non è lo stesso per tutte le specie.

a) La *Physophora*, l'*Agalma* e l'*Halistemma* s'induriscono direttamente in alcool a 35% e dopo quasi un paio d'ore si portano in quello a 70%. Appena la *Ph.* è passata in alcool a 35%, prima che i filamenti pescatori s'irrigidiscano, con l'aiuto di una sottile pinzetta essi si distendono il più possibile. Per cambiare il liquido, che è contenuto nelle campane natatorie, è bene fare delle iniezioni con una pipetta dall' apertura di ciascuna di esse. Quasi sempre si formano nelle campane delle bollicine d'aria che, per la loro tendenza a salire alla superficie, possono alterare la posizione naturale di esse, o, sollevando tutta la colonia, possono schiacciarla contro il pelo del liquido. Per far uscire le dette bollicine basta comprimere leggermente le campane.

b) Il genere *Forskalia* dalla miscela di solfato di rame e sublimato si trasporta nel liquido di FLEMMING², dove può rimanere da 2—6 ore secondo la grandezza della colonia, lavandola dopo per qualche ora in acqua dolce e trasportandola gradatamente in alcool a 70%. L'indurimento delle grandi colonie è meglio farlo nel miscuglio di bicromato di potassio e acido osmico, perché vi si possono lasciare anche più di 24 ore senza che s'induriscano troppo; siccome il bicromato depone dei cristalli nei tessuti, rendendoli opachi, allorché l'animale si passa in alcool, si possono aggiungere a questo liquido alcune gocce di acido solforico concentrato che scioglie i cristalli, dopo di che la colonia si può passare in alcool puro.

Per conservare definitivamente le Physophoridae. dopo che sono rimaste ad indurirsi nell' alcool a 70% nei cristallizzatori per un paio di giorni, si metteranno in tubi, accostando la bocca del tubo

¹ Ho usato io la prima volta questo metodo nel 1885, come risulta da una nota del Prof. LEUCKART inserita nel Zoolog. Anzeiger 8. Bd. a pag. 333, nè da allora in poi altri ne ha fatto menzione se non recentemente il Dr. M. BEDOT che ha descritto un metodo presso che simile (in: Arch. Sc. Physiq. Nat. Genève (3) Tome 21 1889 pag. 556).

² Acido cromico all' 1% 25 c. c., acido osmico all' 1% 10 c. c., acido acetico glaciale 5 c. c., Acqua distillata 60 c. c.

vuoto alla estremità anteriore della colonia, immergendolo lentamente nel liquido e facendovi scivolare dentro cautamente l'animale insieme al liquido. Le piccole *Agalma* e *Halistemma* possono togliersi dall' alcool, afferandole con una pinzetta per l'estremità posteriore, e si fanno entrare con le campane avanti in un tubo completamente pieno di alcool a 70%, il quale dev' essere d'un calibro tale da non permettere che l'animale si pieghi su sè stesso; il tubo vien turato con bambagia e, ad evitare l'evaporazione dell' alcool, si mette in un' altro tubo d'un calibro maggiore anche ripieno di alcool e che si chiuderà con il solito tappo di sughero. Questo sistema del doppio tubo, siccome evita il movimento che fa il liquido, in un recipiente non completamente pieno, è utilissimo per la spedizione e specialmente per la dimostrazione del preparato, e lo consiglio per tutti gli animali molto delicati e con appendici che facilmente si staccano.

Apolemia uvaria. Uccisione come per le precedenti specie, indurimento con acido cromico all' 1% che si sostituirà nello stesso recipiente alla miscela di solfato di rame e sublimato, la quale vien tolta per mezzo di un sifone. Nell' acido si lasciano una ventina di minuti, si lavano dopo con acqua dolce; a questa poi si sostituisce l'alcool per mezzo di un sifone.

Rhizophysa. Si lascia distendere in un bicchiere con poc' acqua e si uccide con sublimato conc. caldo; si lava subito e, trasportata in alcool debole, vi si raggiustano per quanto si può i fili pescatori ed i tentacoli che si sono aggrovigliati durante la manipolazione.

Physalia caravella. Per lasciare bene distendere le appendici ed i polipi, essa si trasporta in un cilindro riempito d'acqua di mare limpida, avendo cura di prenderla per il pneumatoforo, onde evitare la forte azione urticante. La preparazione riesce tanto meglio quanto più alto è il cilindro, poichè i filamenti pescatori sono molto estensibili. Quando l'animale è bene disteso, si uccide versandovi sopra la miscela di sublimato e acido acetico ($\frac{1}{4}$ del volume dell' acqua di mare) e appena esso è morto, nella stessa maniera che si è trasportato prima, si passa in un cilindro simile contenente acido cromico $\frac{1}{2}$ %, e dopo quasi 20 minuti in alcool a 50% e finalmente in quello a 70%.

Hippopodius, *Galeolaria*, *Abyla*. Uccisione con la miscela di solfato di rame e sublimato e poi trasporto diretto in alcool debole. La campana dell' *Abyla* si prepara anche bene col liquido cromo-osmico.

La *Praya* si fissa come l'*Hippopodius*, ma poi s'indurisce col

misuglio di bicromato di potassio e acido osmico, facendovela rimanere uno a due giorni.

Diphyes. Sublimato caldo per ucciderla con la catena degli individui distesa.

La *Verella* si uccide con la miscela cromo-pierica o con quella di sublimato e acido cromico, e dopo pochi minuti si trasporta in alcool debole. La *Porpita* si avvelena lentamente, facendo cadere con una pipetta qualche goccia di liquido di KLEINENBERG nel bicchiere ove è distesa, e quando il bel colore blu della colonia incomincia a diventare rosso, per l'effetto dell' acido, si trasporta in liquido di KLEINENBERG, ove rimane 15 minuti prima di essere messa in alcool debole.

Ctenophora.

Beroe ovata, *Hormiphora*, *Callianira*, *Lampetia*, *Euchlora* e forme giovani di *Cestus*, *Eucharis* e *Bolina*. Si uccidono, facendole cadere nella miscela cromo-osmica, ove restano da 15 a 60 minuti secondo la loro grandezza; dopo si passano in alcool che gradatamente si porta a 70%.

La *B. ovata* s'indurisce in alcool, facendo entrare nella cavità gastrica dalla bocca un tubo di vetro abbastanza grande, per mantenerla gonfiata; la *Beroe* si terrà sospesa nel liquido, lasciando nel tubo capovolto la quantità d'aria sufficiente a farlo galleggiare; questa operazione dev' essere fatta con molta cura per non sciupare le serie longitudinali di palettine vibratili. Dopo uno o due giorni che l'animale è stato in alcool a 70%, si toglie via il tubo e l'animale rimane indurito conservando la sua forma.

La *Beroe Forskalii*, che è schiacciata naturalmente, per morire in istato di espansione ha bisogno di essere immersa nella miscela di solfato di rame e sublimato e, appena morta, s'indurisce nel liquido cromo-osmico per almeno un' ora. Per questa specie non è necessaria l'introduzione del tubo.

La *Callianira*, oltre che col metodo già dato, si può anche ben preparare, fissandola in una miscela composta di

acido pirolignoso conc.	1	volume
sublimato conc.	2	»
acido cromico	$\frac{1}{2}$ %	1 »

Cestus Veneris. L'animale si lascia in poc' acqua e rapidamente vi si versa sopra la miscela cromo-acetica Nr. 1 che deve riempire a tre quarti il recipiente: allora l'animale si disporrà a spira, facendolo poggiare con il lato opposto alla bocca sul fondo. Dopo

10 minuti si laverà con acqua dolce e con molta cura si compirà il cambiamento dei differenti alcool. Gli esemplari da prepararsi devono essere in ottime condizioni, altrimenti li si vedrà gonfiare nel liquido fissatore. Nella miscela cromo-osmica si possono fissare anche bene, ma molti esemplari si sciupano e si colorano troppo, mentre che col metodo precedente diventano bianchi e alquanto trasparenti.

Il *Vexillum* si può preparare con i metodi precedenti.

Echinoderma.

Crinoidea. L'*Antedon rosacea* (*Comatula*) s'immerge direttamente in alcool a 70%, mentre l'*A. phalangium* vi si spezzerebbe, e perciò è necessario ucciderlo in quello a 90%.

Le forme larvali pentacrinoidi si narcotizzano con idrato di cloralio all' 100/00, facendovele rimanere da 2—4 ore; indurite dopo nell' alcool, rimangono con le braccia perfettamente distese. Gli stadii molto avanzati si uccidono benissimo con sublimato conc., ove però si lasceranno solo pochi momenti per evitare che la calce dell'animale sia sciolta.

Asteroidea. Per preparare gli Stelleridi con i piedi ambulacrali in istato di distensione, si fanno morire nell' alcool da 20—30%, disponendoli nel recipiente con i solchi ambulacrali in su.

La *Luidia*, munita di piedi ambulacrali molto sviluppati, si capovolge in un cristallizzatore con poc' acqua di mare, e quando quelli sono distesi, vi si versa su la miscela cromo-acetica Nr. 2: immediatamente dopo l'animale si mette nell' alcool debole.

Nella *Brisinga* facilmente si distaccano le braccia; per evitare ciò s'immerga rapidamente in alcool assoluto.

Ho avuto belle preparazioni di *Bipinnaria*, fissandole con la miscela cromo-acetica Nr. 1, oppure con quella cromo-osmica, ma facendovele rimanere pochi minuti. Altre forme larvali si trattano con sublimato conc.

Gli Ophiuroidea si fanno morire in acqua dolce, perché rimangano distesi e interi; alcune piccole forme (*Amphiura*, *Ophiactis*) si possono fissare direttamente in alcool debole.

L'*Ophiomyza pentagona*, che ha corpo molle, s'indurisce con acido cromico al 1/2%. L'*Ophiopsila annulosa*, che si rompe anche nell' acqua dolce, si ucciderà direttamente in alcool assoluto.

Echinoidea. Per preparare i ricci con i piedi ambulacrali distesi, si mettono in poc' acqua di mare e vi si versa su la miscela cromo-acetica Nr. 2: il trasporto in alcool deve farsi subito dopo,

per non dar tempo all' acido di corrodere la calce dell' animale. Se si vuol conservare il riccio a scopo di anatomia o anche solo per la forma, si dovranno praticare due piccoli fori opposti sul dermascheletro, in modo da far uscire tutto il fluido che contiene, e dopo immergerlo nell' alcoool, facendo riempire di questo liquido la cavità interna. Nel passare l'animale in alcoool più forte si avrà cura di cambiare il liquido anche nell' interno di esso. — Le piccole forme si immergeranno direttamente in alcoool a 70% senza forarle.

Se si vogliono conservare a secco echini, dopo averli liberati dell' acqua che contengono, si lasceranno per uno o più giorni in alcoool a 70% ordinario e poi si faranno seccare all' aria o al sole.

Holothurioidea. Richiedono più cura degli altri echinodermi. perchè, oltre ad avere il corpo molle e molto contrattile, tutti sono muniti di tentacoli che a contatto dei reattivi contraggono o ritirano dentro al corpo. Oltre a ciò diverse specie, non appena s'immergono nel liquido fissatore, espellono tutti gl' intestini e si sformano completamente, cosa, del resto, che fanno anche nell' acqua di mare. se questa subisce lievi alterazioni.

A tutti questi inconvenienti si rimedia nel modo seguente.

Prima di tutto, come gli altri animali che devono distendersi, si mettono in acqua di mare limpida. Si raccomanda per quelle specie che si fissano in acidi, di farvele restare il tempo strettamente necessario per morire, onde non far distruggere i corpuscoli calcarei cutanei.

I grandi esemplari di *Holothuria* e *Stichopus*, appena hanno i tentacoli boccali in piena distensione, si afferrano, stringendoli con due dita o con una pinzetta un pò al disotto dei tentacoli, si tolgono dall'acqua di mare e se ne immerge tutta la parte anteriore in un recipiente alquanto profondo contenente acido acetico concentrato. Nello stesso tempo un' altra persona deve iniettare dell' alcoool a 90% con una siringa, la di cui canula vien introdotta nell' apertura anale dell'animale; si spinga l'alcoool senza grande pressione, per non far gonfiare di troppo il corpo; e non appena l'oloturia è morta, s'immerga in alcoool a 70%, chiudendone l'orifizio anale con un piccolo tappo di sughero per impedire che con l'uscita del liquido non abbia a sgonfiarsi il corpo. L'iniezione deve ripetersi per ogni rinnovamento successivo dell' alcoool.

Per alcune specie, ad esempio l'*H. Poli*, le operazioni si devono fare con molta cautela, perchè la pelle si stacca facilmente.

L'*H. impatiens*, che ha il corpo sottile ed allungato, si afferra stringendola per il collo, onde non far contrarre i tentacoli, e per

l'estremo posteriore, onde non far contrarre il corpo, ed in questa maniera tutto l'animale s'immerge in acido acetico concentrato; quando è morto si trasporta subito in alcool senza bisogno d'iniezione.

Thyone, *Thyonidium*, *Phyllophorus*. Si stringono senza gran forza per il collo e s'immergono in acido acetico con tutto il corpo, e immediatamente dopo fissati si trasportano in alcool debole.

Se gl'individui sono molto piccoli, la pressione sul collo si fa col mezzo di una pinzetta invece che con le dita.

La *Cucumaria Planci* si prepara come le grandi Oloturie, solamente l'iniezione di alcool si fa dalla bocca, avendo lo scopo di far restare gonfi i tentacoli, e non è necessaria la chiusura con il tappo. Le altre specie di *C.* si uccidono nella stessa maniera; le piccole forme non hanno bisogno d'iniezione.

Le grandi *Synapta*, la di cui preparazione è molto difficile per la loro tendenza a spezzarsi, si fissano immergendole in un tubo con acqua di mare ed etere a parti uguali: ivi muoiono completamente distese; si lavano poco dopo in acqua dolce e, passandole in alcool, si avrà cura di farlo gradatamente, per non causare contrazioni. All'etere si può sostituire il cloroformio.

L'indurimento può anche farsi, mescolando all' acqua dolce, allorchè si lavano, 2 o 3 centimetri cubici di acido cromico all' 1%, e dopo pochi secondi si passano in alcool debole.

Con questo metodo ho fissato la rara *Molpadia musculus* e la piccola *Chirodota venusta*.

L'*Auricularia* si uccide bene nel miscuglio di solfato di rame e sublimato o in sublimato solo.

• Enteropneusta.

Il *Balanoglossus* si fissa bene col liquido di KLEINENBERG o in acido cromico al $\frac{1}{2}$ %. Narcotizzandolo in acqua di mare alcoolizzata si hanno esemplari molto bene distesi e dritti. La *Tornaria* si uccide con la miscela di solfato di rame e sublimato, e riesce ben conservata anche con il sublimato conc. e con la miscela cromica.

Vermes.

I Cestodi si fissano con sublimato conc. freddo, i Trematodi con lo stesso, ma caldo. Se se ne vogliono avere preparati schiacciati, onde montarli per il microscopio, si devono mettere fra due lamine di vetro che si comprimono legandole insieme, oppure mettendole in un cristallizzatore sotto leggeri pesi. Quando gli ani-

mali saranno abbastanza schiacciati tra i vetri messi sul fondo del cristallizzatore con poc' acqua di mare, si uccidono, versandovi su del sublimato conc. bollente, lasciandoveli dentro, finchè non danno più segni di contrazioni; poi, togliendo le lamine si lasciano fissare bene i vermi nel sublimato conc. freddo, poichè il sublimato bollente, non penetrando bene fra le due lamine, fissa solamente le parti periferiche di essi.

In questo modo ho avuto preparati ben distesi e appiattiti di *Tristomum*, *Acanthocotyle*, *Distomum*, *Calicotyle* e di molti altri Distomi e Polistomi.

Rhabdocoela e Dendrocoela. Non appena ben distesi in poc' acqua, si uccidono con sublimato conc. bollente, e immediatamente dopo si versano in un recipiente più grande, contenente acqua dolce, onde raffreddare il liquido e gli animali; da questa miscela si trasportano in acqua dolce e dopo alcuni minuti in alcool. Per alcuni Polieladidi (*Eurylepta*, *Pseudoceros*) è necessario che il sublimato sia poco riscaldato, altrimenti il loro corpo si spappola.

Le larve di MÜLLER si uccidono anche bene con il sublimato conc. freddo o bollente.

Nemertini. Molta difficoltà ho incontrato per la preparazione di questi vermi che, non appena si trovano in condizioni ambienti cattive, si contraggono molto espellendo furiosamente la loro proboscide, e riducendosi talvolta in pezzi. Per qualche tempo riuscivo a narcotizzare diverse specie, aggiungendo, a poco a poco, all' acqua di mare dove erano, dell' alcool che, mescolandosi, agiva lentamente e uccideva gli animali; quest' operazione richiedeva molta attenzione e spesso anche, dopo che il verme non dava più segni di vita, trasportato nel liquido fissatore si contraeva e si sformava. Per i grandi esemplari di *Cerebratulus marginatus* che non ne volevano sapere di morire interi col metodo citato, usavo immergerli rapidamente in una miscela fatta di liquido di MÜLLER (7 parti) e acido muriatico conc. (1 parte), dove rimanevano alcuni minuti, e sebbene non appena nel liquido cacciassero fuori la proboscide, non si spezzavano.

Finalmente dopo reiterati esperimenti riuscii (Giugno 1884) a narcotizzare i Nemertini con una soluzione di idrato di cloralio in acqua di mare¹ all' 1⁰⁰/₀₀, dove devono rimanere da 6 a 12 ore, e

¹ Qualche tempo dopo il Dr. A. FOETTINGER in una nota (Renseignements techniques. in: Arch. Biol. Tome 6 1885 pag. 115, dove parla dell' uso del-

s'induriscono dopo nell' alcool in cassette di zinco allungate, con fondo di cera. Gli animali narcotizzati per un tempo non troppo lungo, posti di nuovo in acqua di mare, dopo poco ripigliano i movimenti e ritornano in piena vitalità.

Con questo metodo ho potuto ottenere buone preparazioni dei generi *Carinella*, *Cerebratulus*, *Drepanophorus*, *Nemertes*, *Polia* ecc. in perfetto stato di distensione e con la proboscide a posto; per i generi più resistenti (*Langia*, *Amphiporus* e anche *Drepanophorus*), dopo narcotizzati nella soluzione ad $1^{00}/_{00}$, sarà bene passarli per alcune ore in quella a $2^{00}/_{00}$ prima di ucciderli.

La forma larvale *Pilidium* si uccide o con la miscela di solfato di rame e sublimato o con sublimato concentrato.

I Nematodi liberi e parassiti li ho uccisi sempre con sublimato conc. o con il liquido di KLEINENBERG.

Chaetognatha. Si fissano molto bene nella miscela di solfato di rame e sublimato, e in quella cromo-osmica.

Gephyrea. I *Sipunculus* si uccidono con acido cromico al $1/2 \text{ ‰}$ o anche più debole, dove la maggior parte di essi muore con la tromba distesa; narcotizzati con idrato di cloralio all' $1^{00}/_{00}$ in acqua di mare talvolta pure muoiono distesi; ma succede sempre con ambedue i metodi, o che una porzione degli animali rimangono contratti, o che in alcuni durante l'agonia si rompe la pelle nella parte anteriore con fuoriuscita di tutto il liquido periviscerale, cosicchè il corpo si sforma in parte.

I *Phascolosoma* riescono bene in acqua di mare alcoolizzata, lasciandoveli finchè muoiono (3 a 6 ore).

Il *Phoronis* si lascia un paio d'ore nell' acqua di mare alcoolizzata, dopo si uccide con sublimato conc. bollente.

Per uccidere le grandi *Bonellia* si aspetta, finchè esse abbiano bene distesa la proboscide, e allora si afferra il corpo dell' animale con una mano e l'estremità della proboscide con una pinzetta onde tenerla distesa, e rapidamente s'immerge il tutto in una vaschetta allungata a fondo di cera contenente del liquido di KLEINENBERG, e, tenendo l'animale sempre disteso, per impedire la contrazione, si aspetta, finchè muore; allora si lascia ancora per un' ora nel

l'idrato di cloralio per la narcotizzazione di alcuni animali marini, consigliò di far cadere dei cristalli in fondo al bicchiere in cui sono contenuti. Ma, come giustamente osservasi a pag. 425 del «*Traité des méthodes techniques de l'Anatomie microscopique*» par LEE & HENNEGUY, questo metodo applicato ai nemertini non dà buoni risultati, giacchè gli animali cacciano fuori la proboscide.

liquido prima di passarlo in alcool. — Le piccole *B.* si narcotizzano con acqua di mare alcoolizzata e si fissano in alcool debole. — I maschi pigmei di questi Gefirei si fissano benissimo col sublimato caldo.

Le larve pelagiche di *Echiurus* si fissano bene, lasciandole alcuni minuti nella miscela di solfato di rame e sublimato.

Hirudinei. Le *Pontobdella* ed i *Branchellion* si uccidono in acido cromatico al $\frac{1}{2}\%$. Il sublimato conc. caldo mi ha dato buoni risultati nella preparazione di un nuovo genere che sarà descritto tra poco da S. APATHY sotto il nome di *Pseudobranchellion* e che fu trovato sulla *Thalassoschelys corticata*. Un metodo usato dall'APATHY per fissare gl'irudinei è quello di distenderli nel liquido fissatore in una vaschetta a fondo di cera per mezzo di due spilli che s'infiggono alle estremità del verme.

Chaetopoda. Molti di essi, allorchè s'immergono in un liquido fissatore troppo energico, si contraggono immensamente, si contorcono e molti si spezzano, dando così una cattiva idea della loro forma naturale. Ho rimediato dapprima a questo inconveniente col versare a poco a poco sopra la superficie dell'acqua di mare, contenuta in un cristallizzatore, uno strato di una miscela fatta di glicerina (1 parte), alcool a 70% (2 parti) e acqua di mare (2 parti). Gradatamente questo strato si mescolava all'acqua di mare e gli animali dopo alcune ore erano narcotizzati, tanto da lasciarsi distendere nell'alcool più forte, ove rimanevano perfettamente dritti ed il più delle volte con la proboscide estesa.

L'esperienza mi ha dimostrato che l'alcool da solo basta allo scopo, perciò adesso, invece della miscela predetta, uso mescolare all'acqua di mare il 5% di alcool assoluto e ivi immergo le forme da uccidere, lasciandovele finchè perdono i movimenti, il che accade dopo un tempo che varia per le diverse specie (2—12 ore). È bene che gli animali non muoiano completamente nell'acqua di mare. L'indurimento si fa in alcool a 70% nelle cassette allungate, a fondo di cera, raddrizzandoli, quando è necessario, con l'aiuto di spilli; si lasciano nelle cassette un paio d'ore, dopo di che si mettono in tubi, facendoli rimanere in posizione orizzontale per uno a due giorni; e poi, l'alcool a 70% non penetrando bene nell'animale, per impedirne la macerazione bisogna definitivamente conservarli in alcool a 90%. Per le specie più grandi è utile sospenderle nel tubo con un filo ad un piccolo galleggiante.

Col metodo sopradDETTO si preparano bene gli anellidi apparte-

nenti alle seguenti famiglie: Polygordiides, Opheliadae, Capitellidae, Telethusidae, Maldanidae, Ariciidae, Cirratulidae, Spionidae, Terebellidae con eccezione dei generi *Polymnia* e *Lanice*, che si uccidono con la miscela di sublimato e acido cromico; delle Aphroditidae: alcune Polynoinae e tutte le Sigalioninae; le Amphinomidae che si possono anche fissare bene in sublimato conc.; delle Eunicidae: le Staurocephalinae, le Lysaretinae, e Lumbriconereinae. Nella stessa maniera tutte le Nereidae, Glyceridae, Syllidae, Hesionidae e Phyllodocidae.

Anche della famiglia delle Chlorhaemidae i generi *Stylarioides* e *Trophonia* si narcotizzano con acqua di mare alcoolizzata; il *Siphonostomum diplochaitos* della stessa famiglia si uccide in una soluzione di idrato di cloralio al 5%, indurendolo dopo con acido cromico all' 1%. Questo animale, trattato con i liquidi ordinari, si spezza con la massima facilità.

Le Hermionidae s'immergono direttamente in alcool a 70%, avendo cura di non farli morire curvati.

Le Chaetopteridae, Sternaspidae, i grandi *Spirographis* e le grandi Serpulinae del genere *Protula* (questi due ultimi si fanno uscire prima con molta cura dal loro tubo) si uccidono in acido cromico all' 1%, lasciandoveli almeno una mezz' ora; dopo averli ben lavati si passano in alcool a 70% e poi in quello a 90%.

Col sublimato conc. freddo, facendoveli rimanere non più di 15 minuti, si uccidono i seguenti anellidi: tutte le Amphictenidae, le Hermellidae, le Serpulidae, alcune delle quali si lasciano prima alcune ore in una soluzione di idrato di cloralio all' 100/00, onde farle uscire in parte o interamente dai loro tubi; delle Aphroditidae. alcune Polynoinae, il *Polydontes maxillosus*; delle Eunicidae: tutto il gruppo delle Eunicinae. Alcune di queste, come la *Diopatra*, si fissano bene, narcotizzandole in acqua di mare alcoolizzata.

Le Alciopidae si preparano molto bene, facendole morire nella miscela di solfato di rame e sublimato e lasciandovele al massimo 5 minuti; si abbia cura di lavarle bene in acqua dolce prima di passarle in alcool.

Le Tomopteridae si conservano col metodo precedente o col sublimato conc. freddo.

Crustacea.

I Cladoceri marini (*Podon*, *Evadne*) si uccidono con sublimato conc., o con alcune gocce di acido osmico all' 1% nell' acqua di mare ove sono, finchè diventano leggermente bruni.

Gli Ostracodi direttamente in alcool a 70 %.

Copepoda. I Cop. liberi si fanno morire in una soluzione di sublimato conc. in acqua di mare e vi si lasciano da 5—10 minuti; i parassiti o nel sublimato conc., come i liberi, o direttamente in alcool debole.

Cirripedia. Per preparare *Lepas*, *Conchoderma* ecc. con i cirri distesi, si fanno morire nell' alcool a 35 %, e se in alcune specie si contraggono, è facile tirarli fuori con una pinzetta.

I *Balanus* ecc. s'immergono direttamente in alcool a 70 %, avendo cura di cambiar bene il liquido.

I Rhizocephala (*Sacculina*, *Peltogaster* ecc.) si lasciano per 15 minuti in una miscela di alcool a 90 % e sublimato conc., a parti eguali, dopo si passano in alcool a 70 %.

Amphipoda. Tutti i Laemodipodi, Crevettini ed Iperini si preparano direttamente in alcool a 70 %. Le forme trasparenti dell'ultima divisione (*Phronima* ecc.) in sublimato conc.

Isopoda. In alcool a 70 % direttamente, ad eccezione dei Bopiridi ed Entoniscidi. i quali si mettono nella miscela di alcool a 90 % e sublimato conc. a parti uguali (come i Rhizocephala) oppure in sublimato concentrato.

Cumacea, Stomatopoda: in alcool direttamente. Le larve trasparenti degli Stomatopodi in sublimato conc. per pochi minuti.

Schizopoda: in alcool direttamente o in sublimato conc.

Per evitare che si stacchino le appendici, nei Decapoda, questi si fanno morire in acqua dolce prima di trasportarli in alcool, lasciandoveli però solamente il tempo necessario, altrimenti si gonfieranno le appendici membraniformi.

Per i Paguridi si abbia cura di cambiar bene l'alcool e di conservarli definitivamente in alcool a 90 %, giacchè essi hanno l'addome rivestito di una pelle poco permeabile.

Le larve dei Decapodi (Zoea, Phyllosoma ecc.) si fissano o nel sublimato conc., o con alcune gocce di acido osmico all' 1 % nell'acqua di mare, ove esse si trovano.

Pantopoda.

Si uccidono in acido cromico al 1/2 % per farli rimanere con le gambe distese. Siccome sono quasi sempre coverti di corpi estranei, è necessario lasciarli vivi per alcuni giorni in bicchieri con acqua di mare fresca, affinchè se ne spoglino.

Mollusca.

Per preparare i Lamellibranchi con le valve aperte, si narcotizzano in acqua di mare alcoolizzata, dove rimarranno da 6—12 ore e anche più, secondo le diverse specie. I sifonati devono trasportarsi in alcool solamente dopo essere stati ben narcotizzati, altrimenti i sifoni si contraggono. Per maggior precauzione sarà bene mettere dei pezzettini di legno tra le due valve, per impedirne il ravvicinamento.

La *Lima*, che ha una quantità di tentacoli ai margini del mantello, i quali cadono col metodo dell' acqua alcoolizzata, si ucciderà con acido cromico ad $\frac{1}{4}\%$.

Scaphopoda. I *Dentalium* si narcotizzano con idrato di cloruro al 2% , lasciandoveli dentro da 12—24 ore e più, e passandoli dopo in alcool a 70% .

Gastropoda Prosobranchia. I Placophora e le famiglie Patellidae, Fissurellidae, Haliotidae si preparano distese con l'acqua di mare alcoolizzata.

Per evitare che i Prosobranchi a conchiglia spirale, i quali si sono fatti distendere in acqua di mare alcoolizzata, nel passare in alcool a 70% si ritirino di nuovo completamente nella conchiglia, è mestieri, quando sono in parte narcotizzati nell' acqua di mare alcoolizzata, mantenerli nella massima distensione possibile, legando il lembo interno dell' opercolo alla conchiglia.

La *Natica Josephinia* si può fissare in completa distensione, aggiungendo a poco a poco all' acqua di mare dell' alcool a 70% , finchè non reagisca più allo stimolo, il che succede su per giù dopo 2 o 3 giorni; indi si uccidono, versandovi sopra rapidamente dell' acido acetico conc., e si trasportano subito dopo in alcool debole. Se si vuol essere sicuri di ottenere almeno alcuni individui ben preparati, bisogna provare con più esemplari, perchè sempre alcuni ne rimangono più o meno contratti.

La *Natica millepunctata* ed *hebraea*, preparate con il metodo precedente, restano perfettamente contratte; invece ho avuto buoni risultati, lasciandole per alcuni giorni nella miscela di acqua di mare e acqua dolce a parti uguali e fissandole dopo coll' acido acetico.

Con la stessa miscela ho preparato con l'animale bene disteso diverse specie di *Nassa*, *Columbella*, *Conus* e *Trochus*.

Heteropoda. Le Atlantidae si narcotizzano con acqua di mare alcoolizzata, lasciandovele da 6 a 12 ore: indi direttamente in alcool.

Le Pterotracheidae si uccidono, immergendole nella miscela cromo-acetica Nr. 1 per 10—30 minuti, secondo la loro grandezza, lavandole dopo in acqua dolce e passandole gradatamente nei diversi alcool. Questi animali si preparano bene anche con la miscela cromo-osmica, ed i piccoli esemplari di *Carinaria* benissimo con la miscela di solfato di rame e sublimato; le grandi specie si sospendono nel recipiente definitivo, legando un filo attorno all' estremità della proboscide.

Opisthobranchia. I Bullidi si narcotizzano lentamente nella miscela di acqua dolce e acqua di mare a parti uguali, ove rimangono finchè non reagiscano più allo stimolo; si uccidono finalmente con acido acetico conc. e si trasportano immediatamente dopo in alcool.

Il *Gastropteron Meckelii* si fissa bene nel liquido di KLEINENBERG, conservando alquanto bene il colore naturale rosso, che va via con i liquidi ordinarii.

Il *Doridium* e lo *Scaphander* si narcotizzano in acqua di mare alcoolizzata, si uccidono coll' acido acetico conc. e si trasportano subito dopo in alcool.

La *Philine* si lascia in poc' acqua di mare e, quando è ben distesa, si uccide, versandovi su bruscamente dell' acido acetico conc. o dell' acido pirolignoso concentrato.

La *Pleurophyllidia* si narcotizza con acqua di mare alcoolizzata e dopo si uccide coll' acido acetico concentrato.

L'*Aplysia limacina* e *punctata* si fissano in acido cromico all' 1%, dove rimangono da 15 a 60 minuti, secondo la grandezza dell' animale. L'*A. depilans* si lascia per 12 ore in idrato di cloralio all' 100/00 e dopo si fissa come le specie precedenti.

La *Pleurobranchea Meckelii* si prepara nell' acido cromico all' 1% e vi si lascia quasi un'ora.

I *Pleurobranchus Meckelii* e *testudinarius* si uccidono in acido cromico al 5% e, appena morti, si trasportano in quello all' 1%, ove restano da 15 a 60 minuti, secondo la loro grandezza. I piccoli esemplari si possono anche preparare bene con l'idrato di cloralio all' 100/00, fissandoli dopo con acido cromico all' 1%.

L'*Umbrella* si uccide lentamente nell' acqua di mare alcoolizzata, passandola dopo in alcool debole.

Le Elysiidae ed Aeolidiidae si lasciano distendere in poc' acqua e dopo si uccidono, versandovi su rapidamente dell' acido acetico

conc. in volume doppio o eguale a quello dell' acqua di mare, e passandole, non appena morte, in alcool debole.

La *Phyllirrhoe bucephalum* si fissa nella miscela cromo-osmica per pochi minuti o in quella cromo-acetica Nr. 1.

Doris, *Chromodoris* ecc. Le forme più grosse di questi animali si narcotizzano, aggiungendo all' acqua a poco a poco dell' alcool a 70% e quando, toccando le appendici branchiali del dorso, esse non si contraggono, allora è tempo di ucciderle con acido acetico conc. o con sublimato conc. bollente. Per le piccole forme basta talvolta l'uccisione rapida.

Le *Triopa*, *Idalia* e *Polycera* si fissano bene con l'acido acetico conc. come le Elysiidae.

I grandi esemplari di *Tritonia* s'immergono in acqua dolce, aggiungendovi alcune gocce di acido acetico, finchè muoiono, indi s'induriscono in acido cromico al 1/2%. Con questo metodo restano molto ben distesi e la forma non subisce alcuna alterazione. — La *Marionia* si narcotizza in acqua di mare alcoolizzata e si uccide con l'acido acetico.

Per preparare la *Tethys* con le appendici dorsali a posto, si lascia ben distendere in un recipiente basso e largo nella minor quantità di acqua possibile, ma sufficiente a coprire l'animale; indi si uccide, versandovi su dell' acido acetico conc. in quantità almeno eguale a quella dell' acqua di mare, e poco dopo l'animale muore in uno stato di leggiera contrazione. Allora, per mezzo di un sifone, si toglie il liquido e vi si sostituisce dell' acido cromico all' 1%; ivi cautamente si cerca di dare all' animale la sua forma primitiva, stirando il piede che si fa poggiare sul fondo levigato del recipiente, ed il lobo cefalico che facilmente resta accartocciato. In questa maniera s'indurisce e dopo una mezz' ora con un sifone si sostituisce all' acido cromico l'alcool debole. È necessario che l'animale si sospenda nel recipiente definitivo.

Pteropoda. Le Hyaleidae si dispongono in poc' acqua e, quando gli animali hanno bene distese le due alette, vi si versa su del sublimato conc. e dopo un paio di minuti si lavano. La *Creseis acicula* si prepara bene, uccidendola con l'acqua di mare alcoolizzata.

Le Cymbuliidae si fissano molto bene nel liquido di Perenyi¹, lasciandovele dentro un 15 minuti, e passandole poi in alcool a 50%;

¹ 4 volumi di acido nitrico al 10%,

3 » » » cromico al 1/2%, e

3 » » alcool a 90%.

se si preparano con la miscela cromo-osmica, la loro forma si fissa perfettamente, ma perderanno in parte la trasparenza.

I Gymnosomata si lasciano in idrato di cloradio all' 1⁰⁰/₀₀ da 6—12 ore e dopo si uccidono rapidamente coll' acido acetico o col sublimato. Spesso ho ottenuti buone preparazioni della *Clione*, facendola morire in acido cromatico ad 1/4 ⁰/₀.

Cephalopoda. Le preparazioni riescono molto meglio, quando gli animali s'immergono viventi nei liquidi: quelli già morti da qualche tempo e che sono restati all' asciutto, si lasceranno un'oretta in acqua di mare, ove ripigliano alquanto la loro forma, e dopo il meglio sarà di fissarli in acido cromatico all' 1⁰/₀, lasciandoveli da 15 a 60 minuti, secondo la loro grandezza.

I piccoli Octopodi si lasciano narcotizzare in idrato di cloradio al 2⁰⁰/₀₀ e dopo s'immergono direttamente in alcool, ove talvolta si contraggono, nascondendo il corpo tra le braccia, ma dopo che sono morti, è facile ridare ad essi la forma naturale.

Gli animali più grossi (dalla lunghezza di 15 cm. in poi) si fissano in acido cromatico all' 1⁰/₀, ove rimarranno mezz' ora e, se molto grandi, anche più di due ore; dopo si lavano in acqua dolce e quindi si passano in alcool a 70⁰/₀ che si avrà cura di rinnovare parecchie volte.

L'*Ocythoe catenulata* (*Philonexis*) ♀ di qualunque grandezza si può immergere direttamente in alcool a 70⁰/₀, distendendone le braccia. Lo *Scaevargus tetracirrhus* (*Octopus*) si fa morire nella miscela di alcool e acido cromatico e dopo 20 minuti si può trasportare in alcool.

I Decapodi si possono fissare direttamente in alcool a 70⁰/₀, avendo cura, non appena sono morti, di tirare le due braccia tentacolari che generalmente si contraggono. Le piccole specie sarà bene prima narcotizzarle o in idrato di cloradio al 2⁰⁰/₀₀ oppure in acqua di mare alcoolizzata, e poi immergerle direttamente in alcool.

Per far meglio penetrare l'alcool negl' intestini dei grandissimi esemplari, si fa un sottile taglio nella parte ventrale del corpo.

Le forme pelagiche trasparenti (*Loligopsis*, *Verania*) s'immergono direttamente nel liquido di KLEINENBERG e dopo un' ora si trasportano in alcool debole. Le uova, che formano grappoli o piccoli gruppetti e che sono munite ognuna di un involuero proprio, si fissano in acido cromatico al 1/2 ⁰/₀ e dopo un' ora in alcool debole che si porta gradatamente a 70 ⁰/₀. Quelle contenute in

una sostanza gelatinosa comune, dopo la fissazione con acido cromico al $\frac{1}{2}\%$, si passano in alcool a 50% , dove si terranno definitivamente.

Bryozoa.

I generi *Pedicellina* e *Loxosoma* si lasciano per un' ora in idrato di cloralio all' $100/00$ e poi si uccidono con sublimato conc. freddo o caldo, lavandoli immediatamente dopo.

Alcune specie di *Bugula* (*purpurotincta*, *turbinata*), dopo che gli animali si sono bene distesi in poc' acqua di mare, si uccidono rapidamente con sublimato caldo.

Aggiungendo dell' alcool a 70% lentamente alla superficie dell'acqua in cui sono, ho potuto ottenere in istato di completa distensione le *Flustra*, *Cellepora*, *Crisia*, *Bugula* e *Zoobotrium*; le altre specie si possono uccidere con gli animali più o meno fuori delle cellette in soluzioni deboli di idrato di cloralio, oppure in acqua di mare alcoolizzata, ma generalmente la buona riuscita dipende dall' abilità del preparatore.

Brachiopoda.

Si narcotizzano lasciandoli in acqua di mare alcoolizzata alcune ore e, prima di trasportarli in alcool, si mette tra le valve un piccolo pezzetto di legno, per evitare che si chindano. I piccoli s'immergono direttamente in alcool a 70% .

Tunicata.

Le Appendicularie si fissano lasciandole per cinque minuti nella miscela cromo-osmica.

Ascidiae simplices. Per fissare la *Clavellina* e la *Perophora* in modo che gli orificii rimangano aperti, si lasciano prima distendere bene in acqua di mare corrente e poi si immergono nella soluzione di idrato di cloralio all' $100/00$, dove si lasciano da 6—12 ore; indi si uccidono con la miscela cromo-acetica Nr. 2 e immediatamente dopo si trasportano nell' acido cromico all' 1% di cui si fa un' iniezione dalla bocca di ogni singolo individuo. Dopo una mezz' ora si passano in alcool a 35% , ripetendo l'iniezione con questo liquido, e finalmente in alcool a 70% .

L'*Ascidia* (*Phallusia*) si lascia da 3—6 ore in idrato di cloralio all' $100/00$, e dopo si indurisce in acido cromico all' 1% lasciandovela $\frac{1}{2}$ ora.

La *Ciona intestinalis* si uccide lentamente, facendo cadere nell'acqua di mare, dove è distesa, poche gocce di miscela cromo-ace-

tica Nr. 2; quando l'animale è morto, il che accade dopo circa mezz' ora¹, si prende per l'orificio anteriore, onde evitare che si vuoti dell' acqua che contiene, e si trasporta nell' acido cromatico all' 1%, iniettandone con una pipetta nell' interno dell' animale; e nella stessa maniera si trasporterà poi in alcool debole.

Alcune ascidie (*Ascidia* e *Rhopalea*) si possono uccidere con gli orificii aperti nella seguente maniera: si mettono in un bicchiere piuttosto alto, riempito con acqua di mare in guisa che la superficie di questa stia almeno 4—5 cm. al di sopra degli animali, e vi si versa lentamente a gocce dell' acido cromatico all' 1% in maniera da formare un leggiero strato alla superficie dell' acqua; a poco a poco l'acido cromatico si spande in tutta l'acqua, uccidendo gli animali dopo un tempo che varia da 12—24 ore. Prima dell' indurimento in acido cromatico all' 1%, è bene assicurarsi che l'ascidiasia morta, e se non lo è, si aggiungerà di nuovo una piccola quantità di acido cromatico.

Per *Molgula*, *Polycarpa*, *Rhopalea* e *Chevreulius* (*Rhodosoma*), è necessario lasciarle 12 ore in idrato di cloralio all' 100/00, ucciderle poi con la miscela cromo-acetica Nr. 2 ed indurirle subito dopo col l'acido cromatico all' 1%, per poco tempo.

Cynthia e *Styela* si narcotizzano in idrato di cloralio al 200/00 per 24 ore e dopo si trattano come le specie precedenti. Talvolta la *C. papillosa*, immersa nell' idrato di cloralio al 200/00, contrae molto il corpo: sarà bene allora rimetterla in acqua di mare corrente e riprovare la preparazione con l'idrato di cloralio all' 100/00.

Ascidiae compositae. Le forme gelatinose, ad esempio Botryllidae, *Polycyclus*, *Circinalium* e *Fragarium*, si lasciano per un paio d'ore in idrato di cloralio all' 100/00 e si uccidono, versando sulle colonie del sublimato conc. caldo; immediatamente dopo si passano in acido cromatico al 1/2%, dove rimangono una mezz' ora.

La *Distaplia*, dopo narcotizzata col cloralio, si uccide con la miscela cromo-acetica Nr. 2, trasportandola poi direttamente in alcool debole.

La *Diazona violacea* dovrà rimanere 12 ore in idrato di cloralio al 200/00 e dopo l'uccisione e l'indurimento si tratta come le Botryllidae, con la differenza che si deve iniettare il liquido con una pipetta nei singoli animali.

¹ Il Dr. A. GARBINI nel suo »Manuale per il microscopista«, a pag. 372, dice che, per uccidere le ascidie (con questo metodo (visto da lui nella Stazione Zoologica), ci vogliono 4—5 giorni!

I *Leptoclinum* ed altre forme di una certa consistenza dal clorale si passano direttamente in alcool.

Il *Pyrosoma* s'immerge, sospendendolo ad un filo, in alcool cloridrico contenuto in un recipiente cilindrico; dopo un quarto d'ora si trasporta in alcool a 60% e successivamente nell' alcool più forte. Accade spesso che, al principio, nella colonia si formano una quantità di bollicine d'aria che andranno via dopo qualche tempo che l'animale è già definitivamente conservato.

Le Salpidae comprendono animali di consistenza molto varia, dalla mucosa alla cartilaginea; e certe specie, allorchè sono giovani, sono consistenti, quando sono adulte diventano flosce e di difficile preparazione.

Talvolta le Salpe, quando sono immerse nel liquido fissatore, si contraggono moltissimo, chiudono gli orifici ed in questa posizione muoiono. Ciò si evita, introducendo una bacchettina di vetro per uno degli orifici e così, penetrandovi il liquido, l'animale riprende la forma naturale.

a) Le specie a corpo duro (*Salpa bicaudata* solitaria giovane, *S. Tilesii* catenata e solitaria, *S. zonaria* catenata e solitaria) s'immergono in una miscela di acqua dolce (100 c. c.) e acido acetico conc. (10 c. c.), ove si lasceranno per 15 minuti. Dopo si lavano in acqua dolce per 10 minuti e poi si passano gradatamente in alcool, ove è necessario che le specie più grosse si sospendano per mezzo di uno spillo piegato legato ad un filo e che si conficca nello spessore della massa gelatinosa che è intorno al nucleo intestinale. In questa maniera gli animali restano assai trasparenti, formandosi nei tessuti una quantità di cristalli dei sali marini molto minore che con gli altri liquidi.

b) Le forme semidure (giovani catene e forme solitarie di *S. maxima* e *pinnata*, giovani catene di *S. bicaudata*, ambedue le forme adulte di *S. fusiformis* e *democratica-mucronata*) si fissano nella miscela cromo-acetica Nr. 1 per 10 minuti, passandole dopo direttamente in alcool debole.

c) Le forme molli (grandi esemplari catenati di *S. bicaudata* e *punctata*, di ambedue le forme di *S. maxima* e di *S. pinnata* e *virgola*) s'immergono nella miscela cromo-osmica da 15 a 60 minuti, secondo la loro grandezza, indi si lavano in acqua dolce e si passano in alcool debole.

Gli esemplari molto grandi della *S. maxima*, quando son messi in alcool debole, si schiacciano per il peso del proprio corpo: ho

potuto ovviare a questo inconveniente, o iniettando nella cavità dell'animale alcune bolle d'aria, oppure facendo entrare in detta cavità un sottile tubo di vetro chiuso alle due estremità e che contiene aria. Ciò finchè l'animale non sia perfettamente indurito.

Il Prof. TODARO, per conservare le Salpe a scopo di studi istologici, le immerge direttamente nel liquido di KLEINENBERG, ove restano due ore, e poi le trasporta in alcool: in questa maniera però, salvo le specie dure, perdono completamente la loro forma.

Si può iniettare facilmente nelle salpe viventi il sistema circolatorio con blu di Prussia solubile, mettendo la punta di una siringa a cannula sottile nel cuore e operando con leggerissima pressione; dopo ciò gli animali possono essere trattati con i metodi già detti e il colore rimane benissimo, allorchè si passano in alcool.

I Doliolidi danno belle preparazioni, facendoli morire nella miscela di solfato di rame e sublimato: dopo un paio di minuti si lavano bene con acqua dolce e gradatamente si trasportano in alcool a 70⁰/₀. Con sublimato conc. e con la miscela cromo-osmica si fissano anche molto bene.

Pesci.

In generale non presentano difficoltà per la loro preparazione. Possibilmente si devono immergere viventi nel liquido fissatore, perchè solamente allora conservano bene la forma del corpo e le pinne in completa distensione, mentre che quelli morti da qualche tempo e che sono rimasti a secco, avendo già perduta molt' acqua, hanno le pinne contratte e disseccate e, messi in alcool, si contraggono ancora di più.

Per preparare gli *Amphioxus* con i cirri boccali distesi, si lasciano morire in acqua di mare alcoolizzata al 10⁰/₀ e dopo la morte, che ordinariamente avviene in pochi minuti, si trasportano in alcool a 50⁰/₀ che a poco a poco si porta a 70⁰/₀. Anche col liquido di MÜLLER¹ si raggiunge lo scopo, ma gli animali rimangono colorati e talvolta si formano dei rigonfiamenti ai lati del corpo.

Cyclostomi, Selaci e Ganoidi. Gli esemplari piccoli s'immergono direttamente in alcool a 70⁰/₀; per le forme più grosse, in cui l'alcool difficilmente può penetrare negl' intestini, è necessario fare un' incisione nel ventre. Basta anche l'iniezione di alcool a

¹ Bicromato di potassio grammi 2, solfato di sodio grammo 1, acqua distillata grammi 100.

90% dall' ano, ripetuta ad intervalli e ad ogni rinnovamento di alcool.

Alcune specie di consistenza molle, come la *Torpedo*, si fissano meglio, lasciandole una mezz' ora in acido cromatico all' 1 %.

Gli embrioni di Selaci (da 1—10 cm. di lunghezza) si fissano in sublimato conc., ove si lasciano da 5—15 minuti, avendo cura di lavarli bene poi con l'alcool iodato. Così preparati si prestano anche molto bene per ricerche istologiche. Ho conservato assai bene embrioni di *Torpedo* con tutta la massa vitellina, mettendoli in un miscuglio di acido cromatico all' 1% e sublimato conc. a parti uguali per 15 minuti e passandoli dopo in alcool debole.

Gli embrioni più grandi (oltre i 10 cm. di lunghezza), se servono per lo studio istologico, si possono preparare come i piccoli; se invece se ne vuol fissare bene la forma, si lasceranno per un' ora circa in acido cromatico all' 1%, lavandoli in acqua dolce prima di passarli in alcool.

Se si vogliono conservare per alcuni mesi grandi Selaci, per prepararne dopo lo scheletro, oppure solamente la pelle, se ne dovranno estrarre gli intestini, aprendo il ventre, ed immergerli in una soluzione di cloruro di sodio al 10%.

I Teleostei si trattano come i Selaci, ma l'alcool penetrandovi ancora più difficilmente, è necessario, specialmente per le forme grosse, di iniettare e rinnovare più spesso il liquido.

I Teleostei a pelle argentea (*Trachypterus*) si fissano in sublimato conc. per alcuni minuti; le forme larvali trasparenti o direttamente in alcool debole o in sublimato concentrato.

Le uova fecondate trasparenti si possono conservare a scopo di dimostrazione, lasciandole per alcuni minuti in alcool cloridrico e passandole poi in alcool puro.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mittheilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel](#)

Jahr/Year: 1889-1891

Band/Volume: [9](#)

Autor(en)/Author(s): Lo Bianco Salvatore

Artikel/Article: [Metodi usati nella Stazione Zoologica per la conservazione degli animali marini 435-474](#)