

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCII.

1905

---

SERIE QUINTA

---

RENDICONTI

---

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

---

VOLUME XIV.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1905

perfettamente conservate, non possono avere la stessa provenienza delle altre, ma sono contemporanee alla formazione dei campioni stessi.

Le foraminifere non permettono da sole di giungere ad alcuna conclusione; ma per i campioni superiori anche esse provengono certamente da anteriori formazioni.

Per le dette spicule logorate e per le foraminifere (dei campioni meno profondi) adotto dunque la stessa conclusione che già più volte ho cercato di dimostrare per molti sedimenti dei dintorni di Roma col diuturno esempio delle torbide del Tevere (1).

I molluschi continentali indicati nei campioni meno profondi, vennero frantumati durante la trivellazione e sono contemporanei ai campioni che li contengono e che si deposero in acque nelle quali potevano vivere *Bythinia*, *Limnaea* e *Planorbis*.

Dal confronto fra i campioni di questa trivellazione con quelli della trivellazione di Capo di Bove, pur non essendovi esatta corrispondenza fra i singoli campioni, risulta una certa analogia nell'ordine di successione e specialmente notevole è il fatto che anche qui, sotto a tutta la serie tufaceo-vulcanica, vi sono sedimenti che contengono diatomee d'acqua dolce.

**Bacteriologia agraria.** — *Di una modificazione al metodo d'isolamento dei microorganismi della nitrificazione* (2). Nota di R. PEROTTI, presentata dal Corrispondente G. CUBONI.

La difficoltà di ottenere culture pure dei microorganismi della nitrificazione è stata molto discussa. Come il Winogradsky ha dimostrato, la difficoltà è dovuta alla presenza di tracce anche minime di sostanza organica. Per l'isolamento dei detti microorganismi è necessario quindi valersi di substrati completamente minerali, e le mire costanti degli sperimentatori furono rivolte alla ricerca dei mezzi nutritivi i quali rispondessero allo scopo, pur presentando per quanto fosse possibile i vantaggi delle comuni piastre a base d'agar e di gelatina.

(1) Altro esempio, oltre quelli che ho addotto nei miei scritti, è fornito dai sedimenti del lago di Como studiati recentemente dal prof. Artini (*I sedimenti attuali del lago di Como*, Rend. R. Istituto lombardo, vol. XXXVI, 1903, pagg. 796-802) il quale in tutti i campioni rinvenne avanzi di spongiari e di radiolari provenienti dai calcari del lias inferiore, e trovò inoltre foraminifere ben conservate in due campioni presi rispettivamente alla profondità di 100 e di 160 m. Egli ritiene che queste foraminifere provengano « dalla erosione del lembo pliocenico di Pontegana, presso Balerna » (pag. 799, Mem. cit.).

(2) Lavoro eseguito nel Laboratorio della R. Stazione di Patologia vegetale in Roma.

Prima di tutti il Winogradsky propose l'uso delle sue classiche gelatine siliciche in cui la solidificazione della soluzione nutritiva è ottenuta mediante la coagulazione dell'acido silicico di recente dializzato (1). Ma un tale substrato, volendo pur prescindere dalla difficoltà e lentezza della preparazione, si dissecca facilmente, specialmente dovendo mantenerlo ad una temperatura piuttosto elevata e per un tempo alquanto lungo, quali si richiedono per lo sviluppo delle colonie dei microorganismi in questione.

Omeliansky apportò una modificazione a queste gelatine impiegando il gesso per coagulare il carbonato di magnesio — già riconosciutosi meglio adatto dei carbonati alcalini — e gli altri sali minerali (2). Egli prepara le sue *Gyps-Magnesia-platten* le quali, oltre una più sicura e rapida preparazione, offrono il vantaggio di poter ovviare al loro disseccamento rifornendo nuova soluzione nutritiva.

Tuttavia non si volle completamente abbandonare l'idea di giovarsi degli incontrastati vantaggi dell'agar e perciò il Beijerinck in seguito trovò con successo l'uso di gelatina a base di agar comune privato in precedenza di tutta la parte organica solubile lasciandolo in sottile strato immerso in acqua frequentemente rinnovata (3). L'Omeliansky però, trova questo terreno meno buono.

Di più, Stutzer, modificando alquanto il substrato, usa agar senza alcun speciale trattamento, non si comprende bene quanto in accordo con la supposta azione sfavorevole della sostanza organica (4).

Comunque, mentre il problema per quel che si riferisce ai nitricanti (5), che tollerano la presenza di sostanza organica, è stato risolto dal Winogradsky stesso con la preparazione del suo *nitrit-agar* (6), esso seguita tuttavia ad interessare gli studiosi in quanto riguarda l'isolamento dei nitrosanti.

Recentemente l'Omeliansky propose un altro metodo consistente nel formare dei piccoli pacchi con dischi di carta da filtro mantenuti umettati con la soluzione nutritiva che occupa il fondo della scatola di Petri (7).

Con la presente Nota infine, vengo ad esporre un metodo il quale in sostanza non è forse che una modificazione dei precedenti, ma che trovo facile, speditivo e rispondente allo scopo.

(1) Ann. de l'Inst. Pasteur, 1891, pag. 92.

(2) Cent. f. Bakt., 2, V, 1899, pag. 652.

(3) Cent. f. Bakt., Bd. XIX, 1896, pag. 258.

(4) Cent. f. Bakt., 2, VII, 1901, pag. 168.

(5) Il termine di *nitrificanti* è generico. Si usa indicare con *nitrosanti* quei microorganismi che causano il primo grado di ossidazione dell'ammoniaca, che, cioè, la trasformano in acido nitroso: con *nitricanti* quei che, in secondo grado di ossidazione, trasformano l'acido nitroso in nitrico. In questa Nota non mi riferisco che ai primi; volendo applicare il metodo che espongo agli altri si dovrebbe sostituire nella soluzione citata, al solfato ammonico gr. 1 ‰ di nitrito sodico (Merck).

(6) Cent. f. Bakt. 2, II, 1896, pag. 425.

(7) Cent. f. Bakt., 2, VIII, 1902, pag. 785.

Consiste questo nel valersi dei blocchi di carbonato di magnesio del commercio i quali conservano la loro coerenza, così da poter essere sterilizzati e mantenuti a lungo immersi in parte nel liquido nutritivo, senza richiedere speciali aggiunte.

Tali blocchi si possono foggiare a piastre od a parallelepipedi, le une per tenersi in capsule di Petri, gli altri in tubicini.

Per ottenere le piastre si sega il blocco in più lamine dello spessore di circa un centimetro mediante un sottile spago, poi si leviga la superficie superiore di ciascuna con un vetro non arruotato ed infine si passa su di esse con il polpastrello di un dito. Inferiormente la piastra si foggia a calotta e s'interrompe da un lato la continuità del margine che la fa poggiare sul fondo della scatola che deve contenerla. Tagliata tutt'intorno la piastra con un coltello in modo che tra essa e la parete verticale della capsula resti lo spazio di circa 4-5 millimetri, si fa completamente imbevibile del liquido nutritivo che si ottiene mescolando nel momento dell'uso le tre seguenti soluzioni:

- |                                 |    |                  |
|---------------------------------|----|------------------|
| I. Solfato ammonico . . . . .   | g. | 2-0              |
| Fosfato di potassio . . . . .   | "  | 1-0              |
| Solfato di magnesio . . . . .   | "  | 0-5              |
| Acqua distillata . . . . .      | "  | 1000-0           |
| II. Solfato ferroso . . . . .   | p. | 2-0              |
| Acqua distillata . . . . .      | "  | 100-0            |
| III. Cloruro di sodio . . . . . |    | soluzione satura |

Le proporzioni sono:  $\text{cm}^3$  50 della soluzione I ed una goccia per ciascuna delle altre II e III.

Nel recipiente deve rimanere un eccesso del liquido, in modo che il blocco di magnesio sia immerso in esso per metà del suo spessore. Allora la capsula può sterilizzarsi in corrente di vapore.

I parallelepipedi, della lunghezza di cm. 10-12, larghi cm. 2,5, spessi cm. 1, si tagliano con un coltello dalle lastre precedentemente segate dal blocco di carbonato di magnesio e si levigano come sopra, prima con il vetro poi con il dito. Introdotti nei tubicini, si versa, in questi tanto della soluzione nutritiva quanto basti perchè, dopo imbevutisene i pezzi, restino ancora al fondo del tubo 5-10  $\text{cm}^3$  di liquido. Allora si sterilizza in corrente di vapore.

Tanto in un caso che nell'altro si riesce ad ottenere un substrato solido, a superficie perfettamente levigata, che conserva un grado costante di umidità. Il liquido che per capillarità sale dalla riserva che è al fondo dei recipienti di vetro, impedisce il disseccamento e lo screpolamento dei blocchi poichè difficilmente può venir a mancare la soluzione nutritiva e molto comodamente se ne può aggiungere della nuova.

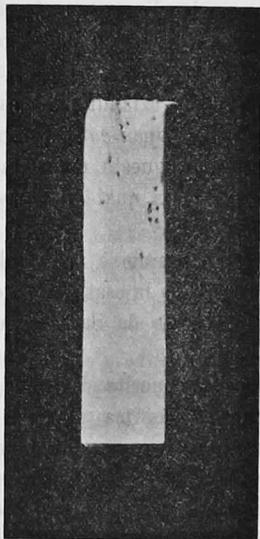
Allo scopo di rendere anche meno frequenti le aggiunte di liquido risponde bene la forma inferiormente scavata dalle piastre, che per tal modo possono a lungo mantenersi in termostato alla temperatura di 28°-30° C.

L'innesto si opera facendo scorrere sulla superficie solida già bagnata la necessaria quantità del liquido, più o meno diluito, contenente i microorganismi.

Dopo un periodo di tempo variabile a seconda dello stato di *virulenza* o meglio di *attività* delle culture, si presentano sulla superficie del carbonato di magnesio delle piccole e regolari escavazioni nelle quali la sostanza della piastra è modificata sensibilmente presentando una colorazione giallo-sporca. All'esame microscopico si riscontrano ivi numerosissimi batteri appartenenti ad una unica specie assai somigliante alla *Nitrosomonas europaea* di Winogradsky. Tali batteri si debbono ritenere causa delle suddette cavità dovute allo scioglimento del carbonato di magnesio per opera dell'acido nitroso formatosi, come è facile assicurarsi facendo la nota reazione della difenilammina.

Eseguiti numerosi passaggi di tali microorganismi in soluzioni a base di solfato ammonico, questo ha subito una rapida nitrosazione.

Nella seguente fotografia è rappresentato un piccolo blocco di carbonato di magnesio sul quale può osservarsi l'aspetto che assumono le colonie di un nitrificante da me ottenuto.



Mediante il metodo esposto come anche con il vecchio metodo delle gelatine Winogradsky, sono riuscito ad isolare da un terreno di Roma una forma di microorganismo nitrosante sulla quale quanto prima riferirò.