

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIV.

1907

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XVI.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1907

Concludendo, il metodo esposto permette di procedere in maniera abbastanza facile e comoda all'analisi di leghe ricche in cromo, e ci offre il modo inoltre di eseguire con una sola presa di saggio la determinazione del cromo, dello zolfo, del fosforo, ed eventualmente anche del manganese e del nichel (1).

Bacteriologia agraria. — *Per l'esame bacteriologico-agrario del terreno.* Nota del dott. R. PEROTTI (2), presentata dal Socio G. CUBONI.

Col progredire delle nostre conoscenze sul significato dell'attività bacterica per la nutrizione delle piante agrarie, si venne a stabilire come le ricerche dalle quali si volle fin qui desumere la fertilità di un terreno, presentassero un lato veramente manchevole. Invero, sebbene non debba cadere alcun dubbio sull'importanza dell'analisi fisica e dell'analisi chimica per la determinazione del valore agrario dei terreni, tuttavia non può disconoscersi che per mezzo di esse non si acquista un'idea giusta dello stato di dinamismo in cui gli elementi nutritivi delle piante vi si trovano e del quale è noto che le piante stesse grandemente si giovano.

Le così dette « prove di vegetazione » le quali erano appunto indirizzate allo scopo di mettere in evidenza sotto questo punto di vista le proprietà di un terreno mediante lo sviluppo di cui su di esso erano capaci le piante, per la limitatezza dello spazio e del tempo in cui debbono eseguirsi non possono essere decisive, nè i risultati, ai quali con esse si addiène, permettono una completa analisi dei fatti così da mettere in evidenza la causa più o meno immediata delle anomalie verificantesi.

All'esame bacteriologico-agrario del terreno si rivolse quindi l'attenzione degli studiosi nella convinzione che dalla conoscenza dello stato bacteriologico di esso si potesse acquistare un concetto di quello stato di mobilità degli elementi nutritivi della quale i bacteri sono i grandi fattori e che costituisce essenzialmente la fertilità del suolo.

Nei metodi di tale esame, non ostante numerosi e pregevoli studi in proposito, bisogna però riconoscere che non si sono realizzati grandi progressi.

Il vecchio metodo della numerazione dei germi su culture in piastre di gelatina di carne, agar nutritivo, ecc., che sortì le sue origini negli istituti d'igiene, pur servendo più o meno egregiamente ai fini ai quali essi mirarono, non può davvero ritenersi che sia riuscito di una grande utilità nelle ricerche di bacteriologia quando s'incominciarono ad applicare all'agricoltura.

(1) Esprimo i miei ringraziamenti al prof. G. Giorgis, che mi fu largo di consigli nello svolgimento di questo mio lavoro.

(2) Lavoro eseguito nella R. Stazione di Patologia Vegetale di Roma.

Caron fu il primo a valersene nelle sue ricerche batteriologico-agrarie ⁽¹⁾; e dopo di lui Hiltner ⁽²⁾, Koch e Thiele ⁽³⁾, Höflich ⁽⁴⁾, Gottheil ⁽⁵⁾, Neide ⁽⁶⁾, ed altri lo usarono o per la numerazione dei germi o per la determinazione delle specie batteriche del terreno. Ma i risultati non furono sempre quei desiderati. La stretta dipendenza del numero delle colonie dalla natura del substrato, l'influenza delle diluizioni, la poca sicurezza nella numerazione: i particolari fenomeni dovuti alla secrezione degli enzimi proteolitici in alcune specie, od alla elettività saprofitica di alcune altre; sono tutte circostanze le quali hanno fornito vasto argomento di critica allo stesso metodo applicato all'esame batteriologico delle acque potabili e che acquistano un valore molto maggiore allorchè lo si vuole estendere all'esame batteriologico del terreno. È noto a tale riguardo come un'intera categoria di microrganismi, la cui funzionalità è della massima importanza nel suolo, non possono svilupparsi negli ordinari mezzi di cultura; sono: i nitroso- ed i nitro-batteri del Winogradsky, gli oligonitrofilo del Beyerinck. Secondo Hiltner anche il radicecola di alcune leguminose (lupino, serradella) richiede alcune speciali condizioni perchè se ne ottenga lo sviluppo nelle culture in piastre.

Per tutti gli accennati inconvenienti che presenta la numerazione dei germi volle il Remy ⁽⁷⁾ proporre un nuovo metodo di esame batteriologico-agrario basato su di un principio molto giusto, la cui applicazione si deve tuttavia far risalire attraverso gli studi dell'Omelianski su gli *Azotobacter* e del Winogradsky su i nitrificanti fino alle osservazioni del Leeuwenhoek su gl'*infusori* dell'acque putride. Consiste esso nell'esame dell'azioni batteriche nelle soluzioni nutritive; e, benchè non permetta l'osservazione e la determinazione delle specie, si deve convenire che è molto rispondente al fine proposti dagli sperimentatori di determinare lo stato di mobilità degli elementi nutritivi nel terreno. Scarsa letteratura possediamo ancora sull'argomento: tuttavia essa ci apprende che il metodo non difetta di mende le quali hanno suggerito i miglioramenti che sono stati già proposti dal Löhnis ⁽⁸⁾ e dall'Ehrenberg ⁽⁹⁾.

⁽¹⁾ Landw. Versuchs-Station, v. 45, pag. 400. Jahrbücher der Deut. Land. Ges., v. 15, pag. 43.

⁽²⁾ *Ueber neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie*. Mitt. d. ökon. Ges. Königr. Sachsen, 4. 1901-02, pag. 2.

⁽³⁾ Protokoll der Sitzung des Sonderausschusses der Deut. Landw. Ges. 10 Feb. 1903.

⁽⁴⁾ *Vergleichende Untersuchungen über die Denitrifikationsbakterien*. Cent. f. Bak., II, VIII, 1902, pag. 404.

⁽⁵⁾ *Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien*. Cent. f. Bak., II, VII, pag. 430.

⁽⁶⁾ *Botanische Beschreibung einiger sporenbildenden Bakterien*. Cent. f. Bak., II, XII, pp. 1, 161, 337, 539.

⁽⁷⁾ *Ein Beitrag zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung*. Cent. f. Bak., II, XII, pp. 262, 448 e II, XIV, pag. 1.

⁽⁸⁾ *Bodenbakteriologische Studien*. Cent. f. Bak., II, VIII, pag. 657.

⁽⁹⁾ *Die bakterielle Bodenuntersuchung in ihrer Bedeutung für die Feststellung der*

Questi lasciano sperare che al detto metodo sia riserbato un non lontano avvenire: tuttavia per ora dobbiamo limitarci a notare come esso non possa sostituire quello antico della numerazione dei germi per il vantaggio che questo presenta con la determinazione delle forme e la molto maggiore semplicità di procedimento.

Il metodo, per quanto difettoso, della numerazione dei germi costituisce uno di quei mezzi di tecnica batteriologica, cui, anche nei rapporti con la agraria, non si può assolutamente rinunciare. Perciò io intesi di migliorarlo in modo da poter conferire ad esso il maggior significato agrario possibile; e mi fu guida in ciò un fatto accertato dal Löhnis, per il quale la cultura dei microbi del terreno si ottiene in modo egregio usando substrati preparati con estratto acquoso di Terra (1). Andando più in là, proposi di valermi dell'estratto preparato con la torba, che, essendo un fattore del terreno vegetale, mi lasciava presumere che avrebbe realizzato nei substrati artificiali le condizioni di sviluppo dei microbi terricoli le quali più si avvicinassero a quelle naturali.

La torba, adunque, come prodotto di una più o meno avanzata decomposizione di piante morte in seno all'acqua, la quale ne impedisce la completa carbonizzazione, è un materiale ancora notevolmente ricco di composti azotati e carbonati che rappresentano gradi differenti della naturale evoluzione che subisce la sostanza organica vegetale morta. Una buona torba, seccata all'aria, con il 15-20 % di acqua, contiene, dall'1 al 2 % di azoto, dal 0,05 al 0,1 % di acido fosforico e potassa.

Il campione di cui mi servii nel presente studio proveniva dalle bonifiche ferraresi e, seccato all'aria, risultò della seguente composizione: per cento:

Acqua	{ 14.66
	{ 14.56
Sostanza organica	{ 80.96
	{ 80.77
Azoto totale	{ 1.31
	{ 1.35
Ceneri	{ 5.37
	{ 5.40

Bodenfruchtbarkeit. Landw. Jahrb., v. Dr. Thiel, v. XXXIII; *Stickstoffverluste in faulenden Peptonlösungen, ein Beitrag zur Methodik der bakteriellen Bodenuntersuchung.* Cent. f. Bak., II, XV, pag. 154.

(1) V. loco citato: Cent. f. Bak., II, XII, pag. 461 e II, XIV, pag. 6.

La soluzione delle ceneri, ottenuta mediante ebullizione moderata per due ore con acido cloridrico di densità 1.10, fornì gli altri dati; per cento:

Anidride fosforica	{ 1.27
	{ 1.15
• solforica	{ 4.36
	{ 4.63
Ossido di potassio	{ 1.28
	{ 1.30
• calcio	{ 8.82
	{ 8.50
Sesquiossidi di ferro e di alluminio	{ 11.96
	{ 11.47

Alla preparazione dell'estratto procedei nel seguente modo:

Gr. 100 della torba, seccata all'aria, si fecero bollire a fiamma diretta per due ore insieme a cm.³ 500 di acqua, ed altri 100 gr. della stessa si lasciarono digerire per due ore in autoclave a 120° C con altri cm³ 500 di acqua. Filtrato il liquido, ch'era di color rosso vinoso scuro, si pressò il residuo, aggiungendo un poco di acqua di lavaggio, e si riunì il nuovo liquido al primo determinando nel risultante l'estratto secco. Questo dette: sostanze minerali ed organiche 6,10 ‰; sostanze minerali 4,25 ‰. In base a questi dati diluì il liquido fino al contenuto dell'1 ‰ di sostanze minerali ed esso risultò di un bel color giallo paglierino, avente reazione leggermente acida e che agitato formava della schiuma. All'analisi risultò contenere piccole quantità di azoto, anidride fosforica, solforica e potassa. Fu sterilizzato nella stufa a vapore acqueo circolante.

Una prima serie di prove con terreni di cultura in piastre a base di estratto di torba preparato nel modo su descritto, fu indirizzata allo scopo di determinare in quali proporzioni si ottenesse lo sviluppo dei germi del terreno su di esso, comparativamente allo sviluppo di cui i medesimi sono capaci nei substrati di ordinario uso.

Agarizzai una parte dell'estratto lasciandolo con la sua naturale e leggerissima acidità ed un'altra parte l'agarizzai rendendola leggermente alcalina con carbonato sodico. Preparai con questi due substrati, con gelatina di carne, con agar nutritivo e con albumose di Heyden (Hesse e Niedner⁽¹⁾) culture in piastre secondo il metodo ordinario, inocolandole con uguali e note quantità di liquido ottenuto dalla diluizione di uno stesso campione di terreno vegetale (gr. 1.0). Dopo alcuni giorni, durante i quali le piastre

(1) *Die Methodik der bakteriologischen Wasseruntersuchung*. Zeit f. Hygiene, XXXIX, 1898, pag. 454.

furono mantenute a temperatura ambiente (15-20° C°), procedei alla conta delle colonie sviluppatasi, che risultò la seguente:

N. della cultura	COMPOSIZIONE del substrato nutritivo	N. dei germi per gr. ³ del campione di terreno dopo:		
		5 giorni	10 giorni	20 giorni
1	Estratto di torba naturale	3.300.000	—	3.625.000
2	" " "	3.080.000	—	3.410.000
3	" " "	2.640.000	—	2.835.000
4	" " legg. alcalino	2.200.000	—	3.190.000
5	" " "	1.980.000	—	2.860.000
6	" " "	1.720.000	—	2.970.000
7	Albumose di Heyden . .	2.087.000	3.100.000	3.740.000
8	" " . .	440.000	1.980.000	3.100.000
9	Agar nutritivo	870.000	950.500	} non aumentarono
10	" "	660.000	830.000	
11	Gelatina di carne . . .	475	} non fu possibile l'ulteriore conta	
12	" "	330		

Da questi primi risultati giova subito dedurre che il numero dei germi del campione di terreno esaminato svelati dalle culture con gelatina di carne ed agar nutritivo fu senza confronto inferiore a quello fornito tanto dalle piastre preparate con estratto di torba quanto da quelle con albumose di Heyden. Eliminando senz'altro dalle ulteriori ricerche i primi terreni che si rivelarono subito impari allo scopo prefissomi, anche per alcune altre ragioni che in appresso esporrò, limitai una seconda prova a meglio stabilire il valore relativo degli ultimi. Soltanto con essi ripetei il procedimento su esposto pervenendo ai seguenti risultati:

N. della cultura	COMPOSIZIONE del substrato nutritivo	N. dei germi per gr. ³ del campione di terreno dopo:		
		5 giorni	10 giorni	20 giorni
1	Estratto di torba naturale	2.220.000	3.350.000	3.520.000
2	" " "	1.860.000	2.800.000	3.300.000
3	" " legg. alcalino	2.540.000	3.395.000	3.960.000
4	" " "	2.420.000	2.750.000	2.860.000
5	Albumose di Heyden . .	2.500.000	3.150.000	3.850.000
6	" "	1.900.000	2.930.000	3.080.000

Si scorge da questi come i due substrati a base di estratto di torba non presentino notevoli differenze nel loro comportamento e, benchè substrati certamente più poveri dell'albumose di Heyden, dal punto di vista del numero dei germi, non forniscono alcun argomento per stabilire di fronte ad esso la loro inferiorità. Anzi è utile notare a questo punto che, mentre tutte le colonie le quali si sviluppano sull'agar di torba acquistano uno sviluppo sensibilmente uguale, alcune di quelle sviluppantesi sull'albumose, perchè aventi maggiore elettività saprofitica, tendono ad assu mere uno sviluppo preponderante sulle altre: fatto che, per il significato agrario dell'esame, potrebbe nuocere.

Ulteriori prove indirizzai al miglioramento del substrato all'estratto di torba procurando di favorire da un lato lo sviluppo dei microrganismi oligonitrofilo, aggiungendo ad esso alimento carboidrato (glucosio), dall'altro dei polinotrofilo aggiungendo al medesimo alimento azotato (albumose). Ottenni due nuovi substrati della seguente composizione:

1. Estratto acquoso di torba 100
 " Nährstoffs' Heyden " 1.3
 Agar 1.5
2. Estratto acquoso di torba 100
 Glucosio 1.0
 Agar 1.5

Con essi, con i due terreni al solo estratto di torba e con albumose di Heyden preparai altre culture in piastre secondo il procedimento su esposto e pervenni a questi nuovi risultati:

N. della cultura	COMPOSIZIONE del substrato nutritivo	N. dei germi per gr. ³ del campione di terreno dopo:		
		5 giorni	10 giorni	20 giorni
1	Estratto di torba naturale	4.840.000	5.030.000	5.588.000
2	" " "	4.620.000	4.900.000	5.280.000
3	" " legg. alcalino	3.520.000	3.880.000	3.960.000
4	" " "	4.730.000	4.840.000	5.060.000
5	" " con glucosio	8.360.000	9.240.000	9.900.000
6	" " "	7.920.000	8.880.000	9.420.000
7	" e nährstoffs' Hey.	6.160.000	6.600.000	6.820.000
8	" " "	6.380.000	7.040.000	7.470.000
9	Albumose di Heyden . .	4.500.000	5.110.000	5.200.000
10	" " . .	3.970.000	4.250.000	4.450.000

Un evidente vantaggio numerico si ottenne in questa prova dall'impiego dell'estratto di torba migliorato con « nährstoff s' Heyden » e più ancora da quello migliorato con glucosio. Dal primo si ottennero alcune specie le quali assunsero uno sviluppo predominante: nell'altro lo sviluppo delle colonie fu presso a poco uguale per tutte le forme fra le quali vi era una larga rappresentanza di ifomiceti ai quali nei rapporti dell'esame batteriologico-agrario del terreno deve attribuirsi non poca importanza.

A conferire un maggiore significato all'ufficio dell'estratto nei substrati di cui sopra institui un'ulteriore prova comparativa fra il terreno all'estratto di torba addizinato di glucosio ed un uguale terreno in cui all'estratto era sostituita l'acqua di condotta. I risultati ottenuti furono:

N. della cultura	COMPOSIZIONE del substrato nutritivo	N. dei germi per gr. ³ del campione di terreno dopo 20 giorni
1	Acqua di condotta e glucosio 1%	600
2	" " "	790
3	Estratto di torba "	2.640.000
4	" " "	2.420.000

} quasi esclusivamente ifomiceti

Infine, volli anche esaminare il comportamento delle specie anaerobie sopra i terreni ad estratto di torba ed allestii alcune culture in piastre che mantenni sotto campana in atmosfera d'idrogeno. I risultati ottenuti sono riportati nel seguente quadro:

N. della cultura	COMPOSIZIONE del substrato nutritivo	N. dei germi per gr. ³ del campione di terreno dopo 20 giorni
1	Estratto di torba naturale . . .	1.755.000
2	" " " . . .	1.510.000
3	" " legg. alcalino . .	48.750
4	" " " . . .	57.500
5	" " e 'nährstoff s' Hey.	2.047.500
6	" " " . . .	1.657.000
7	" " e glucosio . . .	1.365.000
8	" " " . . .	1.565.500

Da essi rilevasi un uguale comportamento dei vari substrati all'estratto di torba di fronte allo sviluppo degli anaerobi, qualora si eccettui il sub-

strato alcalino. I migliori risultati che si ottennero nelle culture aerobiche con l'estratto di torba al glucosio mi sembra che debbono ascriversi allo sviluppo dei microrganismi nitrofilo i quali nelle condizioni dell'ultimo esperimento non potevano svilupparsi.

Riassumendo, da tutti i sopra rilevati fatti si può trarre la seguente conclusione:

Il numero dei germi che nell'esame batteriologico del terreno si ottiene dalle culture in piastre con substrati nutritivi preparati con estratto di torba all'1 ‰ di sostanze minerali ed aggiunta dell'1 ‰ di glucosio è ordinariamente molto superiore a quello dato dai substrati di gelatina di carne e di agar nutritivo (1). Per il loro comportamento si avvicinano di più a quel substrato l'albumose di Heyden e l'estratto di torba addizionato di « nährstoffs' Heyden » non presentandosi tuttavia in questi ultimi uno sviluppo molto uniforme delle colonie. Nel medesimo substrato una larga rappresentanza dei microrganismi rivelati spetta agli ifomiceti.

L'utilità dell'impiego dei substrati culturali « magri » per l'esame batteriologico del terreno, fu già rilevata dal Faelli (2) e dal Frassi (3) che usarono nelle loro ricerche con notevole vantaggio l'albumose di Heyden. Essa risulta molto evidente dai miei studi, con i quali si viene per di più a conferire un significato agrario all'impiego del nuovo substrato a base di estratto di torba per una lunga serie di considerazioni.

Anzitutto l'impiego di un terreno magro, consentendo lo sviluppo dei germi abituati ad un substrato molto povero di sostanze albuminoidi ed azotate in genere, permette di rivelare in numero preponderante i microrganismi nitrofilo. In secondo luogo lo sviluppo d'ifomiceti che si ottiene egregiamente nel substrato di torba permette di apprezzare in modo adeguato un altro fattore della fertilità del terreno sul quale fino ad ora non fu bene attirata l'attenzione. Deve ritenersi che le muffe, abbondantissime nel suolo mediante la loro secrezione acida, abbiano una non piccola parte nei fenomeni di solubilizzazione che avvengono nel terreno agrario. Pur escludendo che l'intensità degli effetti, di cui esse sono capaci, eguagli o solo si avvicini a quella dei batteri, non può disconoscersi che l'inferiorità dalle medesime posseduta sotto tale rapporto deve essere convenientemente compensata dalla incomparabilmente maggiore estensione del loro corpo vegetativo.

(1) È giusto riconoscere che per alcuni terreni i risultati numerici dell'esame batteriologico eseguito con substrati ricchi di sostanze organiche, ed in particolare azotate, possano essere superiori a quelli ottenuti con substrati magri; tuttavia non si può fare a meno di notare come ciò possa verificarsi soltanto in condizioni molto speciali e limitate, le quali non sono certo quelle che si presentano ordinariamente nel terreno agrario.

(2) *Ricerche di Batteriologia Agraria fatte nell'Agro Romano*. Arch. Farm. sperim., III, fasc. I.

(3) *Osservazioni circa la flora batterica del sottosuolo*. Riv. d'Igiene e San. Pubb. XVII, 1906.

Infine, alcuni fatti di cui siamo attualmente in possesso autorizzano a rivolgersi sempre con fiducia all'uso della torba. Come io stesso dimostrarai, la torba favorisce grandemente il processo di ammonizzazione della calcio-cianamide nel quale, insieme ad azioni fisiche e chimiche ha gran parte l'attività batterica (1). (V. anche gli studi del Löhnis (2)). Müntz e Lainé, inoltre, riuscirono a segnalare un altro fatto non meno importante per il quale la torba sarebbe capace di favorire la produzione intensiva dei nitrati, riuscendo essa un mezzo assai propizio al funzionamento dei nitrificanti (3). Tutto ciò, adunque, induce a ritenere con buon fondamento che i microbi, cui spetta una funzione agricola, trovino molto opportune condizioni di sviluppo nella torba, prodotto delle molteplici e complesse azioni degli agenti naturali esercitantesi lentamente e gradualmente su la sostanza vegetale morta.

Tuttavia non dissimulo a me stesso che il metodo della numerazione dei germi, sia pure migliorato come ho sopra proposto, presenta grandi lacune, come in sé, così anche nelle sue applicazioni agli studi di agraria. Infatti, se in esso si realizzano le condizioni migliori per lo sviluppo degli oligonitrofilo non si ottengono quelle più favorevoli ai polinitrofilo.

Permane molto grave la questione se in un substrato di quella natura contenente sostanza organica, possano svilupparsi i nitrosanti. Peraltro, in mancanza di mezzi di tecnica migliori, è mio avviso, che in molti casi non si possa rinunciare al metodo di esame batteriologico in questione specialmente poi quando si consideri che, per il miglioramento proposto, favorendosi in esso lo sviluppo degli oligonitrofilo, si ha modo di porre in evidenza il primo termine del ciclo dell'azoto in natura, che è di base al funzionamento delle principali forme batteriche viventi nel terreno alle quali spetta l'elaborazione dei materiali assimilabili dalle piante superiori.

Fisiologia vegetale. — *Esperienze di selezione ed ibridazione sul frumento e sul granturco.* Nota preventiva del dott. N. STRAMPPELLI, presentata dal Socio G. CUBONI.

Questa Nota sarà pubblicata nel prossimo fascicolo.

(1) *Sopra l'uso della torba per la trasformazione della calcio-cianamide in composti ammoniacali.* Rend. Acc. Lincei, 1905, XIV, pag. 174.

(2) *Se la scomposizione della calcio-cianamide possa avvenire per mezzo dei batteri.* Arch. Farm. sperim., V, 1906.

(3) *Ueber die Zersetzung des « Kalkstickstoff ».* Cent. f. Bak., II, XIV, nn. 3-4, 12-13.

(4) *L'utilisation des tourbières pour la production intensive des nitrates.* Compt. Rendu, 112, pag. 1239.