ATTI

DELLA

REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVII.

1910

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XIX.

1° SEMESTRE.

ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1910

Fisiologia vegetale — *Ricerche sull'assimilazione dell'azoto atmosferico libero nei vegetali* (1). Nota preliminare dei dott. EVA MAMELI e GINO POLLACCI, presentata dal Socio GIOVANNI BRIOSI.

Già fin dal 1771 il Priestley affermava che alcune piante possono assorbire azoto dall'aria, e più tardi l'Ingenhousz estendeva quest'affermazione a tutte le piante. Ma i loro risultati vennero contrastati successivamente dal De Saussure, dal Woodhouse, dal Senebier e più specialmente dal Boussingault.

È nota la celebre polemica che si svolse tra quest'ultimo ed il Ville durante la seconda metà del secolo XIX, l'uno negando, l'altro affermando che le piante assimilano l'azoto atmosferico non combinato, pur basandosi entrambi su un gran numero di esperienze. La soluzione della disputa venne sottoposta al giudizio di una Commissione, la quale, dopo aver ripetuto col Ville e nelle identiche condizioni, le esperienze da lui fatte, venne alla seguente conclusione che crediamo opportuno riportare:

« L'expérience, faite au Muséum d'Histoire Naturelle par M. Ville, « est conforme aux conclusions qu'il avait tirées de ses travaux anté- « rieurs ».

È strano che questa conclusione, che dà piena ragione al Ville, sia poi stata dimenticata, o male interpretata dalla massima parte degli autori (2), forse causa la grande autorità del Boussingault il quale ebbe gran numero di partigiani.

Il problema principale dell'assimilazione *diretta* dell'azoto atmosferico per parte delle Fanerogame, venne in seguito trascurata, specialmente a causa del grande interesse destato dagli importantissimi lavori del Berthelot, del Hellriegel, del Frank, del Willfarth, dello Schloesing, del Laurent, del Winogradsky, ecc. che scopersero e studiarono l'assimilazione dell'azoto atmosferico dovuta ai micromiceti, sia isolati che in simbiosi con piante superiori, attirando essi per lungo tempo sui loro geniali lavori l'attenzione degli studiosi. Nè le Memorie che comparvero negli ultimi anni sull'assimilazione dell'azoto libero atmosferico per opera delle piante superiori, portarono nuova luce su questo importante problema. Dimodochè si può dire che tutt'ora manchino esperienze rigorose (3), e risultati che valgano a decidere in modo

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto botanico della R. Università di Pavia.

(2) Pfeffer, Physiol. veget., I, pag. 401. Paris, 1904.

(3) Come tali non possiamo ritenere quelle recenti del Jamieson, che sono condotte sia istologicamente, che chimicamente, con metodo così poco rigoroso, che non dànno assolutamente seria garanzia sulle affermazioni in esse contenute, come dimostreremo nella Memoria completa.

sicuro tale questione, che, rimasta insoluta dopo la polemica Boussingault-Ville, viene a torto, dalla massima parte degli studiosi, considerata come risolta in favore dell'opinione del Boussingault [1].

Allo scopo di portare nuovo contributo alla risoluzione di questo importantissimo argomento, noi istituimmo delle ricerche, i cui risultati, per quanto non possano venire ancora generalizzati a molte famiglie di piante, pure crediamo bene di rendere ora noti, anche per prender data.

Il metodo seguito nelle nostre ricerche fu il seguente: le piante sottoposte ad osservazione si fecero sviluppare in matracci o sotto campane ermeticamente chiuse e accuratamente sterilizzate, entro le quali passava dell'aria completamente esente da composti azotati e da microrganismi. I primi venivano trattenuti facendo passare l'aria ambiente, prima attraverso lunghi tubi contenenti pomice imbevuta di acido solforico concentrato, e di potassa, poi attraverso boccie di lavaggio ad acido solforico e ad acqua; i secondi per mezzo di filtri di cotone sterilizzato. Prima di farla entrare nelle campane, l'aria veniva arricchita di una determinata quantità (4 %) di anidride carbonica pura. Le culture vennero fatte, parte in mezzo liquido, parte in sabbia di quarzo purissima. I liquidi nutritizî, sterilizzati, erano esenti da nitriti, nitrati, sostanze ammoniacali e sostanze organiche azotate ed avevano la seguente composizione:

	Per le crittogame e le piante acquatiche	Per le fanerogame
KH_2PO_4	gr. 0,2	gr. 0,4
$CaSO_4$	» 0,2	» 0,4
$MgSO_4$	» 0,2	» 0,4
$Fe_2(PO_4)_2$	» 0,02	» 0,04
H_2O	» 1000	» 1000

Nelle nostre esperienze cercammo di studiare l'assimilazione dell'azoto in piante appartenenti a gruppi, classi ed ordini diversi, seminando per le crittogame spore e talli piccolissimi, e per le fanerogame, sia terrestri che acquatiche, semi, anch'essi sterilizzati e di dimensioni molto piccole, o, per alcune specie, piccoli propaguli.

Data la tenue quantità di azoto contenuta in questo materiale, è lecito dedurre che la notevole quantità di esso, contenuta nelle piante ben sviluppate che noi ottenemmo, debba provenire dall'azoto libero dell'atmosfera, non avendone esse a disposizione da alcun'altra sorgente; l'analisi chimica infatti ha confermato ciò.

La descrizione completa del metodo, i numerosi risultati ottenuti e le relative analisi saranno pubblicate allorchè le esperienze tuttora in corso saranno ultimate.

[1] Tanto più che nelle esperienze del Boussingault a noi pare non siano state del tutto evitate le cause d'errore, come avremo occasione di dimostrare.

Per ora rendiamo noti i risultati seguenti:

1). Sottili sezioni, fatte al microtomo, di talli di licheni (*Physcia parietina*, *Cladonia furcata*, *Lecidea* sp.) messe sopra quarzo e gesso, inumiditi con la soluzione nutritizia suddetta, diedero dopo qualche mese, col metodo di cultura sopra descritto, dei piccoli talli normali. Risultato eguale si è ottenuto sinteticamente usando, invece delle piccole sezioni, spore di licheni e di *Protococcus*.

2). Piccoli protalli di felci posti nelle stesse condizioni di cultura, hanno vegetato e prodotto piantine agamiche ben sviluppate. Queste culture non progredirono però per molto tempo, per cause diverse. Sono in corso altre esperienze in proposito.

3). Ottimi risultati ottenemmo anche con culture di *Salvinia auriculata* e di *Azolla caroliniana*. Messe in liquido nutritizio, secondo il metodo sopra descritto, delle piantine con poche foglie, queste vegetarono e si moltiplicarono dando — come nelle condizioni normali — numerose altre piantine a foglie ben sviluppate, che si rendevano indipendenti l'una dall'altra. Era quindi evidente la non piccola quantità di azoto libero che esse avevano assimilato dall'atmosfera. Così da quattro piantine che avevano complessivamente 10 foglie, dopo otto mesi di cultura, se ne sono ottenute 92; in altra cultura durata 45 giorni, da 200 foglie se ne ebbero 479 e analoghi risultati abbiamo ottenuto costantemente da numerose altre culture.

4). Fra le piante superiori, quelle che ci hanno dato finora migliori risultati sono state le *Lemne* (*major* e *minor*), dalle quali ottenemmo costantemente, partendo da poche foglioline, la formazione di numerose piante prodottesi per gemmazione. Esempio: 200 foglie di *Lemna major*, pesanti gr. 0,6185, diedero dopo 41 giorni di cultura 454 foglie, pesanti gr. 1,8425, realizzando quindi un aumento in peso fresco di gr. 1,2240, ossia del 197,89 %.

5). Piante di diverse specie (*Anthurium*, *Salvinia*, *Lemna*, *Tradescantia*, *Salvia*, *Begonia*, *Canna*, ecc.) tenute per molti giorni sotto campana in aria confinata, ne assorbirono una parte (come veniva facilmente dimostrato da appositi manometri — con termometro per la correzione — applicati alle campane) e l'analisi dell'aria rimasta dimostrò che nel maggior numero dei casi era avvenuta (in tali condizioni) una diminuzione nella percentuale dell'azoto gasoso. L'azoto libero è stato dunque assorbito dalle piante mantenute per un certo tempo in aria confinata.

È bene notare che nei liquidi di cultura, esaminati dopo un lungo periodo di vegetazione, non si trovarono i bacteri nitrificati, nè alcuna traccia di azoto combinato.

Le nostre esperienze ci dimostrarono altresì che non tutte le piante sono egualmente capaci di tale assimilazione. Questo fatto verrebbe a giustificare in parte le controversie che sin qui hanno dominato su quest'argo-

mento, e forse è da attribuirsi ad esso la convinzione, generalmente accettata, della non assimilazione dell'azoto libero atmosferico per parte dei vegetali superiori, convinzione che ha ritardato la risoluzione di un problema tanto importante per la Fisiologia vegetale e per la Biologia in genere, per quanto il metodo dimostrativo da seguirsi fosse assai semplice.

Riportiamo in questa Nota preventiva alcuni dati ottenuti dalle analisi fatte, riservandoci di riferire per esteso i risultati complessivi.

Il metodo seguito per la ricerca quantitativa dell'azoto contenuto nelle piante fu quello di Kjeldahl modificato dall'Jodlbauer, che è il più indicato per l'analisi dell'azoto nelle piante, poichè dà modo di calcolare l'azoto totale in esse contenuto, compreso quello dei nitrati.

Risultati:

I. *Azolla caroliniana*. Durata della cultura: un mese. Aumento dell'N in peso dopo la cultura 75,67 %.

II. *Lemna major*. Durata della cultura: quaranta giorni. Aumento dell'N in peso dopo la cultura 89,47 %.

III. *Lemna minor*. Durata della cultura: quaranta giorni. Aumento dell'N in peso dopo la cultura 133,33 %.

Per l'analisi dei gas usammo per l'ossigeno tanto il metodo Lindemann quanto quello con l'acido pirogallico, e per l'anidride carbonica la potassa caustica.

I gas combustibili eventualmente presenti venivano bruciati in pipetta eudiometrica. L'azoto era calcolato per differenza. Gli apparecchi usati furono quelli di Hempel e di Gino Pollacci.

Risultati:

I. *Salvinia auriculata*. Durata della cultura: due mesi. Diminuzione in volume dell'N nell'aria confinata 2,77 %.

II. *Anthurium* sp. Durata della cultura: due mesi. Diminuzione in volume dell'N nell'aria confinata 12,98 %.

III. *Tradescantia* sp. Durata della cultura: due mesi. Diminuzione in volume dell'N nell'aria confinata 6,11 %.

IV. *Salvia* sp. Durata della cultura: due mesi. Diminuzione in volume dell'N nell'aria confinata 3,71 %.

Questi ultimi risultati non hanno valore come dati analitici quantitativi perchè la percentuale dell'azoto diminuita, dipende dalla quantità d'aria contenuta entro la campana e soprattutto dallo sviluppo e dal numero degli organi vegetativi della pianta, fattori dei quali non tenemmo conto, ma dimostrano in modo certo che la pianta ha assorbito dell'azoto libero.