

ATTI  
DELLA  
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

---

SERIE QUINTA

---

RENDICONTI

---

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

---

VOLUME XXIV.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCÆI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

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

In una Nota preliminare sull'assimilazione dell'azoto pubblicata nel 1909 e nella successiva Memoria completa (2), noi riferimmo i risultati di numerose ricerche sperimentali il cui scopo era quello di studiare l'assimilazione dell'azoto libero dell'aria in piante appartenenti a ordini diversi (dalle alghe alle fanerogame superiori).

In tali esperienze erano da noi state evitate le cause d'errore dovute: 1° all'incompleta sterilizzazione delle culture; 2° alla presenza dei composti azotati dell'aria; 3° allo sviluppo incompleto delle piante; 4° ai metodi analitici di dosaggio dell'azoto totale; cause d'errore che complessivamente non erano state evitate da nessuno degli autori che ci avevano preceduto nello studio di quest'importante problema.

Le culture vennero fatte, parte in mezzo liquido, parte in sabbia di quarzo puro. Le soluzioni nutritive adoperate furono: la soluzione completa Knop e una soluzione nutritiva priva di composti azotati, così costituita: H<sub>2</sub>O gr. 1000 ; CaHPO<sub>4</sub> gr. 0,50 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gr. 0,25 ; MgSO<sub>4</sub> gr. 0,25 ; CaSO<sub>4</sub> gr. 0,25 ; Fe<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> gr. 0,02.

I metodi d'analisi adoperati furono:

1°) *L'analisi indiretta*, consistente nella ricerca dell'azoto contenuto nei semi e nel substrato, e di quello rimasto nel terreno e contenuto nella pianta. La differenza tra le due somme ci dava la quantità di azoto guadagnata o perduta.

2°) *L'analisi diretta*, consistente nell'analisi dell'aria confinata in cui alcune piante avevano vissuto per qualche mese. Per confronto con l'analisi dell'aria esterna, riportata a pressione e a temperatura eguale, si notava se le piante avevano o no sottratto azoto all'atmosfera.

I risultati ottenuti dalle culture e dalle analisi, concordi nella quasi totalità, ci permisero di concludere che la proprietà di assimilare l'azoto libero dell'aria, dalla maggioranza degli autori attribuita al solo plasma

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto botanico di Pavia, aprile 1915.

(2) Mameli E. e Pollacci G., *Sull'assimilazione diretta dell'azoto atmosferico libero nei vegetali* (Atti Ist. botanico di Pavia, XIV, pp. 159-257), 1911 con 3 tavole.

dei bacteri, e fortemente discussa per le alghe, potesse estendersi « anche alle Crittogame vascolari e alle Fanerogame, in generale al plasma vegetale, *tenendo ben presente tuttavia, che le condizioni di cultura, sia chimiche che fisiologiche, influiscono potentemente sul fenomeno* ». È appunto per quest'ultima ragione che, in piante ottenute da culture fatte in laboratorio noi riuscimmo a constatare l'assimilazione di quantità d'azoto libero relativamente tenui, ciò tuttavia non diminuisce l'importanza del fenomeno e non esclude che in determinate condizioni di sviluppo — a noi per ora ignote — i vegetali possano usufruire con grande attività dell'azoto libero atmosferico.

Fra i principali risultati da noi ottenuti erano i seguenti, che riportiamo integralmente, perchè necessari agli scopi critici che si prefigge la seguente Nota:

« Tra le Hydropteridee: l'*Azolla caroliniana* e la *Salvinia natans* si dimostrarono straordinariamente atte all'assimilazione dell'azoto libero atmosferico. Se per la prima specie la sterilizzazione non poteva effettuarsi completamente causa la sua nota simbiosi con l'*Anabaena*, la seconda specie invece venne resa completamente sterile per mezzo dell'acqua ossigenata, che si dimostrò un disinfettante utilissimo per tal genere di esperienze. Le analisi, sia delle piante, sia dell'aria in cui esse avevano vissuto, confermarono i risultati che già dallo sviluppo apparente delle piante si potevano prevedere;

« La *Lemna major* e la *L. minor*, rese sterili e coltivate in soluzione sterile esente d'azoto combinato, si svilupparono abbondantemente e diedero all'analisi notevoli aumenti d'azoto;

« Culture di *Raphanus sativus*, di *Acer Negundo*, di *Cucurbita Pepo*, di *Polygonum Fagopyrum*, ottenute in substrati sterili, ed in ambiente esente di composti azotati, diedero all'analisi notevoli aumenti di azoto, pienamente giustificati dalla completa astinenza di azoto combinato a cui queste piante erano state costrette.

Il loro sviluppo, relativamente alle condizioni in cui le piante crescevano, era notevole, e dimostrava anche *a priori* che esse assimilavano lo azoto libero atmosferico;

« Culture delle stesse piante, ottenute in substrato contenente una quantità nota di azoto combinato e in aria priva di composti azotati, diedero anch'esse all'analisi aumenti d'azoto notevoli, e variabili a seconda della quantità d'azoto somministrato. Si osserva cioè che ad una maggiore quantità di azoto ricevuta dalla pianta, corrisponde una minore attività assimilatrice dell'azoto libero, e che, mentre la pianta che ha assimilato tutto l'azoto combinato che le è stato fornito, dà la maggiore percentuale di azoto libero assorbito; il contrario avviene per quelle piante che, al momento dell'analisi, non avevano assorbito che una parte dell'azoto del terreno ».

Due brevi Note <sup>(1)</sup> apparse su quest'argomento dopo la pubblicazione del nostro lavoro, ci porgono l'occasione di confermare pienamente i risultati delle nostre esperienze, che non sono per nulla infirmati da quelli di Oes e di Molliard, date le condizioni specialissime nelle quali questi autori hanno posto a vegetare le piante sottoposte ad esperienza, invece di attersi al metodo da noi seguito.

Oes conferma anzitutto le nostre ricerche per ciò che riguarda l'assimilazione dell'azoto libero dell'aria per parte dell'*Asolla*, concludendo anche egli che quando la pianta manca di nitrati nel substrato si contenta di un'altra sorgente di azoto; e che questa mancanza di azoto combinato può, in buone condizioni di cultura, agire come stimolo d'accrescimento.

Che nel caso dell'*Asolla* l'assimilazione dell'azoto libero sia facilitata dall'associazione simbiotica di questa pianta con alghe del genere *Anabaena*, non è una scoperta dell'Oes, come sembrerebbe da alcune parole della Nota di Molliard, ma è un fatto che era stato già da noi constatato (vedi pag. 62 della nostra Memoria), tanto che dichiarammo che la sterilizzazione di queste piante non era possibile, data la presenza di endofiti nei loro tessuti. Tuttavia, che la presenza dell'alga sia indispensabile per l'assimilazione dell'azoto libero da parte dell'*Asolla*, neanche l'Oes ha dimostrato, nè poteva farlo, dato che questa simbiosi è largamente diffusa in tutte le *Asolla*, e data l'impossibilità di privare la pianta del suo ospite. Con tutta probabilità la consociazione favorisce e rende più copiosa l'assimilazione dell'azoto libero, dato che, come diversi autori dimostrarono, e noi confermammo, vi sono alghe capaci di tale assimilazione.

Contrariamente a ciò che avviene nell'*Asolla*, Oes afferma che *Salvinia auriculata*, *Lemna trisulca*, *L. gibba* e *L. polyrrhiza*, coltivate in soluzioni nutritizie esenti d'azoto, non assimilano l'azoto libero dell'aria. Osserviamo anzitutto che la soluzione nutritizia priva d'azoto somministrata dall'autore a queste delicate piante acquatiche, doveva necessariamente essere inadatta al loro sviluppo se non addirittura nociva, e che essa è ben diversa da quella da noi usata. Infatti, la soluzione usata da Oes è così costituita: H<sub>2</sub>O dist. gr. 1000; MgSO<sub>4</sub> gr. 0,25; CaCl<sub>2</sub> gr. 1 oppure gr. 0,62; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gr. 0,50; KCl gr. 0,12; Fe<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub> tracce.

È noto che i sali di cloro più adatti per la nutrizione vegetale sono quelli di potassio e di sodio; Wypfel <sup>(2)</sup> inoltre trovò che soluzioni di cloruri (di magnesio, calcio, potassio e alluminio), in concentrazioni varie dal

<sup>(1)</sup> Oes A., *Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Azolla* (Zeitschr. f. Bot., V, 145), 1913; Molliard M., *L'azote libre et les plantes supérieures* (Comptes rendus de l'Ac. d. Sciences, 160, 310), 1915.

<sup>(2)</sup> Wypfel M., *Weitere Versuche über den Einfluss der Chloride auf das Wachstum der Pflanze* (Jahresber. d. Niederöster. Landes-Realgymn., 23, 1892).

0,5 al 2 %, sono nocive per piantine di *Zea*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Cucurbita*, ecc.

Nella soluzione adoperata da Oes il tenore in cloruri è del 0,074-0,112 %, percentuale rappresentata in massima parte da cloruro di calcio ch'è tra i sali di cloro uno fra i più nocivi alle piante; non si capisce quindi perchè egli abbia scelto tale sale e l'abbia somministrato in dosi tanto elevate. Inoltre, il trasporto delle piantine dall'acqua dolce del fossato o della vasca nella quale vivevano, ad una soluzione siffatta non può essere avvenuto senza che il loro sistema radicale ne abbia in qualche modo sofferto.

Un altro appunto che dobbiamo fare alla Nota di Oes è quello della assoluta mancanza di analisi per ciò che riguarda le *Salvinia* e le *Lemna*. Mentre le analisi riportate dall'autore per le *Azolla* sono numerose, per le altre piante non v'è parola, nè di analisi dell'aria dalla quale l'azoto libero potesse o no essere stato sottratto, nè delle piante stesse. È bensì vero che lo scarso sviluppo delle culture ottenute dall'Oes, data la soluzione nutritiva ch'egli usò, doveva essere poco incoraggiante per intraprendere la ricerca analitica, ma non è men vero che in questioni così delicate e precise di chimica fisiologica solo l'analisi rigorosamente condotta può dire l'ultima parola.

Le esperienze del Molliard riguardano esclusivamente dieci culture di *Raphanus sativus*, ottenute in soluzione nutritiva contenente l'azoto sotto forma di cloruro ammonico. Dalle analisi fatte egli ottiene, in quattro casi, un aumento d'azoto, e precisamente di mg. 0,19; 0,09; 0,12; 0,17 (risultati che, nonostante siano stati ottenuti da piante poste in condizioni di cultura inadatte al loro buon sviluppo, sono conformi a quelli da noi ottenuti); in sei casi, invece, una diminuzione di mg. 0,02; 0,13; 0,16; 0,15; 0,08; 0,10. Dopo ciò l'autore conclude che il *Raphanus sativus* non ha la proprietà di utilizzare l'azoto libero dell'aria.

Che questa deduzione sia, più che affrettata, illogica, noi possiamo affermarlo riportando integralmente le seguenti parole dello stesso Molliard, che ne fanno fede:

« À la vérité, je me suis placé, pour ces premières expériences, dans des conditions un peu spéciales; les plantes ont toujours eu à leur disposition de l'azote combiné et, d'après Mameli et Pollacci, l'assimilation de l'azote de l'air serait favorisée par la faim de la plante en azote combiné; d'autre part, les plantes ont eu à leur disposition du glucose et, de ce fait, leur nutrition a été en grande partie saprophytique ».

Noi aggiungiamo che non solo per queste due ragioni la soluzione nutritiva adoperata dall'autore era la meno adatta per la dimostrazione in parola, ma che essa doveva necessariamente essere di ostacolo allo sviluppo delle piantine, data l'eccessiva quantità di glucosio (50 gr. per 1 litro!) in essa contenuta. Infatti, osservando al microscopio tessuti di piantine di



*Raphanus sativus* coltivate in una soluzione nutritizia contenente glucosio nella proporzione di gr. 50 per un litro, come ha usato Molliard, si nota un'accentuata plasmolisi nelle cellule dell'apice radicale. Oltre a ciò, lo sviluppo delle piantine è evidentemente ostacolato e quasi arrestato, quindi, piante in condizioni così anormali non sono certo adatte per controllare le nostre ricerche.

L'autore non descrive l'aspetto delle piante al termine delle culture, che vennero fatte su pomice granulare, imbevuta della soluzione nutritizia.

Per ciò che riguarda le analisi fatte da Molliard osserviamo che varie sono in esse le cause d'errore, e cioè:

1°) L'analisi del liquido nutritizio dopo la cultura. L'autore dice di aver constatato che « si può spostare tutta l'ammoniaca dei liquidi in presenza della pomice, a condizione di polverizzare questa e di raccogliere alla distillazione in presenza di potassa un volume di liquido considerevole ». Ora, è inevitabile che perdita d'azoto vi sia stata e nella polverizzazione della pietra pomice e nella susseguente distillazione « di un volume di liquido considerevole », che si rese necessario per trascinare nel distillato tutti i composti azotati residuali. Un'analisi siffatta, applicata al solo residuo rimasto nel substrato dopo le culture, è tanto più una causa d'errore, perchè ad essa non fa riscontro un'analisi fatta in eguali condizioni e che avrebbe potuto compensarlo, e cioè l'analisi del substrato prima della cultura, poichè, supponendo purissima la pietra pomice, la quantità d'azoto contenuta nel liquido nutritizio somministrato era nota, data la composizione fissa di esso.

Da questo diverso metodo di apprezzamento deriva che nella disegualianza:

$$\begin{array}{rcccl} \text{N del seme} + & \text{N della soluzione} & > & \text{N della soluzione} & \\ & \text{al principio della} & & \text{alla fine della} & + \text{N della pianta} \\ & \text{cultura.} & < & \text{cultura.} & \end{array}$$

si ottiene nella seconda somma una quantità d'azoto minore di quella realmente presente.

2°) L'uso del semplice metodo Kjeldahl per il dosaggio dell'azoto totale delle piante. Noi, infatti, facemmo osservare nel nostro lavoro che « il metodo Kjeldahl, eseguito col semplice procedimento dettato dall'autore, permette di dosare solo l'azoto organico e l'azoto amidico, ma non è neppure certo che con questo metodo si riesca ad intaccare qualunque sostanza organica azotata, poichè, ad esempio, gli alcaloidi e le nucleine vegetali hanno una costituzione così complessa che il loro azoto offre una grande resistenza alla riduzione in ammoniaca ». Applicammo quindi in tutte le nostre analisi il metodo Kjeldahl modificato da Jodlbauer, che permette di dosare l'azoto organico, più l'azoto nitrico, anche in dosi minime, quali sono quelle che si trovano di solito nei vegetali. Si ottiene, infatti, con questo metodo la

scomposizione completa di tutte le sostanze azotate, come dimostrano le analisi di prova fatte dall'autore stesso con sostanze diverse, e da noi ripetute con quantità note di nitrato e nitrito potassico e di asparagina.

Sono dunque certamente andate perdute nelle analisi del Molliard fatte col semplice metodo Kjeldahl quelle piccole quantità d'azoto provenienti dalla decomposizione dei composti nitrici, degli alcaloidi e delle nucleine vegetali, e questo, tanto nelle analisi dei semi e delle piante, quanto in quelle del liquido nutritizio dopo la cultura; poichè, per quanto la soluzione contenesse l'azoto esclusivamente sotto forma di composto ammoniacale, pure non è da escludere che, in presenza delle secrezioni radicali delle piante e della pietra pomice granulare che potè anche esercitare un'azione catalitica, fossero presenti in questo liquido, alla fine della cultura, piccole quantità di nitrati o di nitriti.

3°) L'incostanza dei risultati ottenuti dall'autore, nelle sue poche analisi: aumento d'azoto in quattro casi, diminuzione negli altri sei.

Aggiungiamo in fine che causa d'errore non trascurabile in esperienze siffatte deve essere stata la piccolissima quantità di liquido nutritizio (60 cm.<sup>3</sup>) somministrata a ciascuna cultura, per una durata di 7 settimane.

Non è da meravigliarsi quindi se tante diverse cause d'errore insieme unite: 1) soluzione nutritizia inadatta; 2) somministrazione di essa alle piante in quantità insufficiente; 3) metodi analitici poco precisi; abbiano condotto a risultati incostanti, alcuni dei quali tuttavia in accordo coi nostri, ed abbiano ostacolata la constatazione dei piccoli aumenti di azoto, quali sono quelli che possono verificarsi in una pianta di *Raphanus sativus* coltivata in tali condizioni in laboratorio.

Non v'ha dubbio che la scelta di mezzi nutritizi più adatti e l'esclusione delle cause d'errore delle quali abbiamo fatto cenno al principio della presente Nota, confermeranno quanto è risultato dalle nostre numerose esperienze rigorosamente condotte, e che ci occuparono per più di due anni, e cioè che « la facoltà di assimilare l'azoto libero atmosferico è proprietà assai più diffusa di quanto fino ad ora si ammetteva, e che è presumibile che anche tutti i vegetali clorofilliani, dalle alghe alle fanerogame, possano, in condizioni speciali, far uso, con maggiore o minore attività, di questo potere.