

SOCIETA ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO

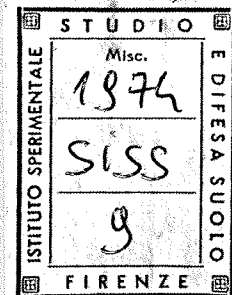
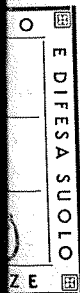
ATTI  
DEL CONVEGNO SUL TEMA:  
ASPETTI CHIMICI E MICROBIOLOGICI  
DELL' INQUINAMENTO DEL SUOLO

---

Editi a cura dell'Istituto di Chimica Agraria  
dell'Università di Milano, con il contributo del C.N.R.

---

MILANO 18 giugno 1974



SOCIETA' ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO

ATTI DEL CONVEGNO SUL TEMA  
ASPETTI CHIMICI E MICROBIOLOGICI DELL'INQUINAMENTO DEL SUOLO

ISTITUTO SPERIMENTALE PER LO STUDIO E LA DIFESA DEL SUOLO	
Inventario N.	
Collocazione:	M IV 99

Edita a cura dell'Istituto di Chimica Agraria  
dell'Università di Milano, con il contributo del C.N.R.

MILANO 18 giugno 1974

COMITATO ORGANIZZATORE

Prof. C.A. Cecconi

Prof. G. Florenzano

Prof.ssa L. Goldberg Federico

Prof. A. Malquori

Prof. R. Materassi

Prof. G. Picci

Prof. V. Treccani degli Alfieri

## ELENCO DEI PARTECIPANTI

ABRATE Dr. Ezio - Associazione Irrig. Est Sesia - Novara  
ANNICHIARICO-PETRUZZELLI SEBASTIANI Dr.ssa Laetitia - Isti  
tuto di Igiene - CNR - Università - Roma  
ANTONELLI Dr. Carlo - Soc. SIPCAM - Milano  
ARCARA Dr. Pier Giacomo - Istituto Sperimentale Difesa del  
Suolo - Firenze  
ARDUINO Prof. ssa Enza - Istituto di Chimica Agraria, - Uni  
versità - Torino  
ARU Prof. Angelo - Centro Regionale Agrario Sperimentale -  
Cagliari  
BALLONI Prof. Waldemaro - Istituto di Microbiologia Agrar-  
ria e Tecnica, Università - Firenze  
BASADONNA BAGGI Dr.ssa Grazia - Istituto di Microbiologia  
Agraria e Tecnica, Università - Milano  
BASILE Dr. Gino - Istituto di Chimica Agraria, Università  
Portici  
BENELLI Dr.ssa Tatiana - Istituto di Chimica Agraria, Uni  
versità - Milano  
BIANCOTTI Dr. Augusto - Istituto di Geologia, Università  
Torino  
BRUNO Prof. Vincenzo - Istituto di Chimica Agraria, Uni-  
versità - Firenze  
BUGINI Dr. Fernando - Milano  
BUONDONNO Prof. Corrado - Istituto di Chimica Agraria, Uni  
versità - Portici  
CANDUSSIO Prof. Renzo - Istituto Sperimentale per la Nutri-  
zione delle Piante - Gorizia  
CAPPELLI Dr. Mario - Istituto di Selvicoltura, Università  
Padova  
CASATI Dr. Pompeo - Istituto di Geologia, Università -  
Milano  
CITERNESI Dr. Ugo - Istituto di Microbiologia Agraria e  
Tecnica, Università - Firenze  
CORBERI Prof.ssa Elisa - Istituto di Microbiologia Agraria



- e Tecnica, Università - Milano
- DE BERTOLDI Dr. Marco - Istituto di Microbiologia Agraria  
e Tecnica, Università - Pisa
- DEL RE Prof. Attilio - Istituto di Chimica Agraria, Uni-  
versità - Piacenza
- DURANTI Dr. Giovanni - Ente Nazionale Cellulosa e Carta,  
Roma
- ESCHENA Prof. Tomaso - Istituto Chimica Agraria, Universi-  
tà; Portici
- FARACI Geom. Enzo - Associazione Irrig. Est Sesia - Novara
- FARINI Dr.ssa Anna - Istituto di Chimica Agraria, Universi-  
tà - Milano
- FAVILLI Prof. Franco - Istituto di Microbiologia Agraria e  
Tecnica, Università - Firenze
- FAVINI Prof. Franco - Istituto di Chimica Agraria, Universi-  
tà - Torino
- FLORENZANO Prof. Gino - Istituto di Microbiologia Agraria e  
Tecnica, Università - Firenze
- FOSSATI GALLI Prof.ssa Enrica - Istituto di Microbiologia  
Agraria e Tecnica, Università - Milano
- FRISON Dr. Giuseppe - Istituto di Sperimentazione per la Piop-  
picoltura - Casale Monferrato
- FUSI Prof. Paolo - Istituto di Chimica Agraria, Università  
Firenze
- GENEVINI Dr. Pier Luigi - Istituto di Chimica Agraria, Univer-  
sità - Milano
- GESSA Prof. Carlo - Istituto di Chimica Agraria, Università  
Sassari
- GIOVANNONZZI-SERMANNI Prof. Giovanni - Laboratorio di Radiobio-  
chimica ed Ecofisiologia Vegetali del CNR - Roma
- GOLDBERG FEDERICO Prof.ssa Linda - Istituto di Chimica Agrar-  
ia, Università - Milano
- LEVI-MINZI Dr. Renato - Istituto di Chimica Agraria, Univer-  
sità - Pisa
- LUZZATI Prof.ssa Ada - Istituto Sperimentale per la Nutrizio-  
ne delle Piante - Torino

- MANCINI Prof. Fiorenzo - Istituto di Geologia Applicata  
Università, Firenze
- MANNINO Dr. Saverio - Istituto di Chimica Agraria, Univer-  
sità - Milano
- MARTINOTTI Dr. ssa Franca - Cattedra di Geochimica, Univer-  
sità - Milano
- MATERASSI Prof. Riccardo - Istituto di Microbiologia Agra-  
ria e Tecnica, Università - Firenze
- MAUCERI Dr. Vincenzo - Laboratorio Analisi Pedologiche -  
Campo dei Fiori (Varese)
- NIGRO Prof. Carlo- Istituto Sperimentale Nutrizione Pian-  
te- Roma
- NUTI Dr. Marco Paolo- Istituto di Microbiologia Agraria e  
Tecnica, Università- Pisa
- OTTOGALLI Prof. Giogio- Istituto di Microbiologia Agraria  
e Tecnica, Università- Milano
- PACINI Prof. ssa Novella- Istituto di Microbiologia Agraria  
e Tecnica, Università- Milano
- PARIS Prof. Paolo- Istituto di Agronomia Generale, Univer-  
sità- Piacenza
- PERACCHIO Dr. Walter- Laboratorio Analisi Pedologiche- Cam-  
po dei Fiori (Varese)
- PICCI Prof. Giovanni- Istituto di Microbiologia Agraria e  
Tecnica, Università- Pisa
- PICCONE Prof. Giuseppe- Istituto di Chimica Agraria, Uni-  
versità- Torino
- PIOVANELLI Dr. Carlo- Istituto Sperimentale per lo Studio  
e la Difesa del Suolo- Firenze
- POTENZA FIORENTINI Prof. ssa Maria- Istituto di Geochimica  
Economico-Ambientale, Università - Milano
- QUARTIERI BOLLANI Dr. Alessandro- Istituto di Microbiologia  
Agraria e Tecnica, Università- Milano
- ROMANIN VISINTINI Prof. ssa Maria- Istituto Sperimentale per  
la Nutrizione delle Piante - Gorizia
- ROSSI Dr. Nino - Istituto di Chimica Agraria, Università -  
Bologna

SAPETTI Prof. Carlo - Istituto di Chimica Agraria, Università - Torino

SILVA Prof. Sandro- Istituto di Chimica Agraria, Università - Piacenza

SORLINI Dr.ssa Claudia- Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università- Milano

TARSITANI Dr. Gianfranco- Istituto di Igiene "G.Sanarelli", Università- Roma

TESTINI Prof. Ciro - Istituto di Chimica Agraria, Università- Sassari

TRECCANI DEGLI ALFIERI Prof. Vittorio - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università- Milano

VANDONI Dr.ssa Maria Vittoria- Istituto di Chimica Agraria, Università- Milano

VANNÓZZI Dr. Gian Paolo- Istituto di Agronomia, Università- Pisa

VIDRICH Dr. Veriano- Istituto di Chimica Agraria, Università- Firenze

VIGANO' Piero- Istituto Chimica Agraria, Università- Milano

VIOLANTE Dr. Antonio- Istituto di Chimica Agraria, Università- Portici

ZALTIERI Dr. Anacleto- Istituto di Chimica Agraria, Università- Milano

SALUTO DEL PRESIDENTE DELLA SOCIETA' ITALIANA  
DELLA SCIENZA DEL SUOLO

Cari Colleghi e Consoci,

sono lieto di aprire questo convegno che due Commissioni della nostra Società hanno voluto indire in questa magnifica sala del Museo della Scienza e della Tecnica. E' la prima volta che la Società tiene una riunione in Milano e mi fa piacere vedere molti Consoci affluiti dalle diverse sedi settentrionali e che non spesso hanno partecipato alle sedute che abbiamo tenuto in città per loro lontane e disagiate.

Il tema, o meglio, i temi odierni interessano in primo luogo i chimici agrari e i microbiologi ma non v'è dubbio alcuno che sono anche all'attenzione generale. Il Consiglio della Società ha preferito, via via che se ne presentava l'occasione, dibattere argomenti talora assai specializzati, altre volte più generali ma che erano di viva attualità.

La riprova che eravamo nel giusto si ha esaminando quali iniziative si sono avute di recente in campo internazionale. Con il collega ed amico Angelo Aru, presidente della V<sup>^</sup> Commissione della Società, abbiamo partecipato dal 10 al 14 giugno in Roma, a una qualificata riunione organizzata dalla FAO intitolata "Expert consultation on soil degradation" e alla cui riuscita hanno dato opera studiosi provenienti da tutti i continenti e specialisti di campi assai diversi. Ecco che in una settimana sono stati esaminati i vari aspetti della degradazione del suolo intesa nel senso più largo. Dall'erosione alla polluzione chimica, dai ristagni d'acqua alla salinità, ai problemi dei rifiuti. Si è visto anche come lottare contro questi fenomeni e le modalità dei controlli con cartografe via via più aggiornate delle varie situazioni. Un ap-

proccio globale dunque di estremo interesse e che andrà seguito ed aiutato nel suo cammino. Noi molto più modestamente, in relazione anche alle nostre forze, abbiamo affrontato via via temi più ristretti ma non c'è dubbio che il nostro traguardo finale sia non dissimile, una miglior conoscenza del suolo, dei fenomeni che lo degradano, dei metodi per migliorarlo e conservarlo.

Con questo spirito ci accingiamo ad ascoltare la relazione della Signora Federico Goldberg, quella del collega Picci e le preannunziate numerose comunicazioni che sono certo daranno luogo a un dibattito di alto livello.

Prima di dare la parola alla Signora Federico consentitemi tuttavia di porgere a Lei, all'amico Treccani, ai loro collaboratori, il ringraziamento più vivo e cordiale per la ottima organizzazione di questo Convegno e per quanto vorranno fare anche in seguito per arrivare alla pubblicazione degli Atti della riunione odierna. Solo chi si è già sobbarcato simili fatiche si rende conto che non è lavoro da poco e quindi rinnovo a tutti loro l'apprezzamento più sincero della Società.

La parola alla Signora Federico.

Prof. L. Mancini

## ASPETTI CHIMICI DELL'INQUINAMENTO DEL SUOLO

L. Goldberg Federico

Istituto di Chimica Agraria, Università di Milano

Questa relazione non vuole essere una dissertazione di carattere generale sul problema della polluzione del suolo, ma piuttosto l'esposizione di alcune considerazioni scaturite dai molti rilevamenti sperimentali che il nostro I=stituto ha avuto modo di compiere in questi ul=timi anni.

Prima di entrare in argomento mi sembra op=portuno peraltro richiamare una definizione del termine "polluzione" nella sua accezione gene=rica e quindi chiarire cosa s'intende specifi=catamente per polluzione del suolo. In realtà se è estremamente complesso definire la pollu=zione in senso lato, ancora più difficile è specificare cosa s'intende per inquinamento del suolo.

Di fatto non vi è una definizione di pollu=zione generalmente accettata: tra le più valide potrei citare quella riportata nel rapporto del "Envinromental Pollution Panel" (1965) che dice: "Una alterazione sfavorevole delle nostre condi=zioni ambientali determinata per intero o in larga parte dall'azione dell'uomo attraverso effetti o modificazioni diretti o indiretti negli scambi di energia, nei livelli delle radiazioni, nella costituzione chimica e fisica e nell'abbondanza di organismi. Queste modificazioni possono agire sull'uomo direttamente oppure attraverso l'acqua o i prodotti agricoli e biologici."

Come tutte le definizioni che ho avuto mo=

do di trovare in letteratura anche questa è piuttosto vaga in quanto implica una valutazione arbitraria di una "sfavorevole" alterazione delle condizioni ambientali e un giudizio su quali siano le condizioni ambientali ottimali.

Più semplice, in teoria, dovrebbe essere la definizione di inquinazione dell'acqua e dell'aria essendo la prima un prodotto puro e la seconda di costituzione estremamente semplice. In realtà, in natura, nè l'una nè l'altra si trovano in questo stato ideale, ma al contrario modificano continuamente la loro composizione acquistando e perdendo una serie di sostanze che si muovono ciclicamente nell'ambiente. Per cui, anche in questo caso in modo vago, si è giunti a definire l'inquinamento dell'acqua e dell'aria come "l'immissione di sostanze estranee che ne alterino i fondamentali equilibri naturali".

Per il terreno le cose si complicano ulteriormente. Intanto esso contiene una serie praticamente infinita di sostanze organiche ed inorganiche (compresi alcuni composti clororganici naturali) i cui contenuti sono oltretutto estremamente variabili. In secondo luogo più vari, complessi ed interdipendenti sono i processi chimico-fisici e biologici peculiari del suolo e da cui dipende in larga misura la sua produttività. Per cui non ritengo completamente valida la definizione di Rennie (1966) che così si esprime: "ogni sostanza, comune od estranea al sistema suolo, che aggiunta ad esso, direttamente o indirettamente ne influenza negativamente la produttività (produttività che include i due parametri : resa e qualità del prodotto) è definita inquinante del suolo".

E' infatti estremamente difficile, direi

impossibile , stabilire degli indici che diano un quadro sufficientemente valido per stabilire lo stato di contaminazione del suolo. Per le acque disponiamo di alcuni parametri chimici e biologici che , pur soggetti a critiche , permettono di giudicare la qualità di un corpo idrico o la sua idoneità ad un determinato uso. Ma per il terreno quali parametri possiamo utilizzare ? Potremo parlare, a mio avviso, tutt'al più di un particolare tipo di polluzione quale ad esempio quello da tensioattivi, da pesticidi, da metalli pesanti, da oli minerali, da idrocarburi, ecc.

Fatte queste considerazioni di carattere generale, resta da vedere quali sono le strade che conducono all'inquinamento del suolo. Come è noto esse sono tre : l'inquinamento atmosferico, la larga e spesso indiscriminata utilizzazione di pesticidi nella pratica agricola, e infine l'inquinamento delle acque irrigue.

E' evidente che l'inquinamento atmosferico ha un peso notevole quando si prendono in considerazione la rottura di certi equilibri naturali, la modificazione delle condizioni ambientali ovvero gli effetti sulla salute umana. Tuttavia, anche se nell'inquinamento dell'ambiente extraurbano una componente atmosferica esiste, essa, almeno per quanto riguarda l'agricoltura, è di scarso valore e comunque circoscritta in zone assai limitate. Generalmente il rapporto tra cultura e inquinanti atmosferici è diretto senza cioè la mediazione del terreno il quale, pertanto, solo sporadicamente viene contaminato per questa via.

I pesticidi sono divenuti potenziali poluenti dal 1940, anno in cui cominciò a diffon-



dersi e a dilatarsi enormemente il loro uso. Il che ha posto ben presto sul tappeto il problema della valutazione dei loro effetti non solo per quanto concerne la loro eventuale tossicità per l'uomo, ma anche e soprattutto quella per gli animali domestici, le culture, la fauna selvatica, la vegetazione naturale nonché per i microorganismi terrestri ed acquatici. Le interazioni terreno-pesticidi ed in modo particolare la loro persistenza nel terreno costituiscono un altro aspetto del problema. Per ragioni di tempo, mi limiterò ad accennare alle due categorie più importanti : gli erbicidi e gli insetticidi.

Per quel che concerne gli erbicidi, in questi ultimi anni, si è molto sperimentato sia per quanto riguarda il meccanismo della loro fissazione da parte dei costituenti colloidali del terreno e la possibilità della loro eluizione, sia per quel che concerne il meccanismo biochimico della loro decomposizione.

Ad esempio, recenti esperienze hanno dimostrato come la massima parte degli erbicidi vengano assorbiti dal terreno; tra gli altri i dipiridilici diquat e paraquat (Malquori et al., 1966 - Radaelli et al. 1968), le triazine simmetriche quali la prometrina, la simazina, l'artrazina (Malquori et al., 1966- Fusi et al., 1968-1969), il trifuralin (Petrosini et al., 1970), il 2-6-diclorobenzonitrile (Petrosini et al., 1968). Mentre peraltro le triazine, il trifuralin e il diclorobenzonitrile sono assorbiti in misura maggiore dai colloidi organici che non da quelli minerali, l'inverso si verifica per i derivati dipiridilici. In quest'ultimo caso infatti i colloidi umici, pur essendo caratterizzati da una capacità di scambio cationica notevolmen-

te più elevata di quella dei minerali argillosi sperimentati, si sono dimostrati meno adatti a trattenere il diquat.

La possibilità di eluzione ad opera di elettroliti è, ovviamente, in relazione alla forza di trattenimento; in altri termini i dipiridilici vengono rilasciati meno facilmente degli scambiatori inorganici che non da quelli organici; esiste inoltre una concentrazione minima di composto al di sotto della quale non è più possibile l'eluzione. Per le triazine il rilascio è ovviamente più facile dai colloidi argillosi che non dai colloidi organici.

Ho voluto sottolineare questa differenza di comportamento non tanto per discutere sul meccanismo di assorbimento di tali composti, quanto per dimostrare come ogni prodotto abbia un suo comportamento particolare; come sia diverso, da caso a caso, il meccanismo di fissazione e di rilascio e come, quindi, non sia possibile generalizzare le conoscenze acquisite per un determinato composto.

Circa l'inattivazione degli erbicidi nel terreno, è noto che essa può avvenire prevalentemente per via chimico-fisica o prevalentemente per via biologica. I Proff. Florenzano e Treccani hanno già parlato, in altra sede, di questo aspetto del problema e illustrato le tappe metaboliche della decomposizione degli erbicidi attuata dai microrganismi del suolo. Mi sembra utile però accennare al fatto che una contaminazione del terreno da diserbanti non appare molto probabile. La loro persistenza è infatti limitata nel tempo in quanto possono essere metabolizzati dalla flora microbica, decomposti per via chimica o fotochimica, assorbiti dai colloidi

del terreno in forma attiva o inattiva o, infine, possono essere dispersi per volatilizzazione.

Passando agli insetticidi, è noto come i cloroderivati organici siano tra i composti più stabili e persistenti.

Il composto notoriamente più stabile è il DDT, il quale persiste nel terreno anche decine di anni. Seguono, in ordine decrescente, il Dieldrin, il Lindano, il Clordano, l'Eptacloro e l'Aldrin (Edwards, 1966).

Negli U.S.A. (e speriamo anche in Italia) l'uso dei composti più persistenti è notevolmente diminuito negli ultimi anni e di conseguenza vanno diminuendo anche le concentrazioni dei residui nel terreno; nello stato del Michigan per esempio il 41% dei campioni esaminati conteneva meno di 0,3 ppm di residui clorurati organici globali (O.E.C.D. 1966).

In Inghilterra sono stati riscontrati nel terreno valori di 0,5 ppm Dieldrin e 2 ppm di DDT (Wheatley et al., 1962); nel Portogallo concentrazioni di 0,1 ppm di Aldrin e 0,6 ppm di Dieldrin (O.E.C.D., 1966).

Per quanto concerne l'Italia, sono a mia conoscenza unicamente i dati di Paccagnella e Prati (1971) e Kanitz e Castello (1967). Paccagnella e Prati hanno analizzato, comparativamente, terreni prelevati in un frutteto del Ferrarese, zona dove i pesticidi organici di sintesi sono largamente utilizzati da alcuni decenni (il consumo di tali prodotti in questa zona è dieci volte superiore a quello medio nazionale), e terreni prelevati in provincia di Rovigo in una area cioè prevalentemente a cultura orticola, dove l'impiego dei pesticidi è più recente e nettamente inferiore. Tutti i campioni prelevati in

provincia di Ferrara sono risultati "inquinati" e su valori elevati (3,9 mg/Kg come residui globali di composti clorurati organici).

I residui di DDT, per frequenza e concentrazione, sono risultati i più elevati, a conferma della loro particolare stabilità e del più forte consumo. I campioni controllati in provincia di Rovigo sono risultati inquinati meno frequentemente e su livelli nettamente inferiori, più alti peraltro di quelli riscontrati da Kanitz e Castello in terreni della Liguria.

Ma c'è da chiedersi: cosa dicono in realtà queste cifre? Ai livelli sopra citati si manifesta veramente un'influenza negativa sulla microflora o sulla vegetazione tale da incidere sulla produttività del terreno? In altri termini, è stata determinata la soglia di contenuto oltre la quale il terreno può considerarsi veramente inquinato? A me non risulta.

Piuttosto, molto interessanti sono, a mio avviso, i dati rilevati dagli AA sopradetti circa il contenuto in clorurati organici delle acque di falda sottostanti i terreni esaminati. Esso rispecchia abbastanza fedelmente, lo stato di inquinamento proprio dei terreni soprastanti, compatibilmente peraltro con le loro caratteristiche.

Per quanto concerne infine la contaminazione del suolo da esteri fosforici essa non si prospetta come molto probabile in quanto essi sono inclini per la loro struttura ad una più o meno rapida inattivazione grazie a reazioni di ordine chimico catalizzate da alcuni componenti normali del terreno.

Da quanto sopra emerge chiaramente che lo inquinamento atmosferico e l'uso sia pure ec-

cessivo e talvolta irrazionale dei pesticidi nella pratica agricola portano raramente ad un tangibile stato di compromissione del suolo. Ben più gravi sono, in questo senso, le conseguenze dell'inquinamento delle acque irrigue. In termini economici è stato stimato dall'ISVET (1969) che il danno che l'agricoltura italiana subisce per effetto dell'inquinamento di origine industriale e domestico delle acque irrigue è dello ordine, in termini di prodotto netto, di 12-13 miliardi di lire annue con una incidenza di circa il 18% sul valore complessivo del prodotto netto realizzato sulle superfici soggette ad inquinamento. Io, ovviamente, non entro nel merito dell'aspetto economico del problema: mi limito a citare dette cifre per dare una dimensione al fenomeno.

Come ho già accennato in precedenza, data la complessità del problema, è opportuno, per essere concreti, parlare di casi particolari di polluzione.

Per quanto concerne la possibile contaminazione da tensioattivi le esperienze di laboratorio condotte presso il nostro Istituto hanno dimostrato che la soglia oltre la quale essi manifestano una valutabile azione negativa sul potere nitrificante e sull'attività respiratoria del terreno nonchè sulla germinazione ed il primo sviluppo dei vegetali superiori è di 0,01% rispetto al terreno corrispondente a 100 ppm e riferendosi allo strato arabile a 300 Kg/Ha (Goldberg et al. 1965-1966-1967-1968-1969-1973). Trattandosi di esperienze di laboratorio, io presumo che, in campo, questa cifra possa essere leggermente più elevata. Il problema, a mio avviso, riveste una certa importanza solo nei ca

si, peraltro abbastanza frequenti, di immissioni di scarichi domestici di agglomerati urbani in corpi idrici destinati all'irrigazione. In un caso del genere abbiamo riscontrato valori oscillanti da un minimo di 6 mg/Kg (18 Kg/Ha) ad un massimo di 33 mg/Kg (100 Kg/Ha) in relazione alla distanza del punto di prelievo dall'immissione del cavo.

Ma quello che mi preme sottolineare è che i detergenti riscontrati erano costituiti esclusivamente da LAS cioè da alchil-benzensolfonati a catena lineare e quindi biodegradabili. Tale riconoscimento è stato possibile grazie alla applicazione di una metodologia messa a punto nel nostro Istituto in collaborazione con l'Istituto di Microbiologia diretto dal Prof. Trecani. Essa si basa sulla desolfonazione del detergente, previamente estratto dal terreno con alcol etilico, e la successiva analisi gascromatografica dell'idrocarburo così ottenuto (Catalani et al. 1974). Il metodo è stato tarato con LAS puri, sintetizzati presso l'Istituto di Microbiologia, e ABS di produzione industriale. Ovviamente una sola constatazione non può essere generalizzata. Tuttavia, se rilevamenti successivi confermeranno questa constatazione, vorrà dire che l'industria si è adeguata alle disposizioni di legge. E poichè, in base alle nostre esperienze, i LAS, contrariamente a quanto dimostrato con la fauna ittica, non sono più tossici degli ABS nei confronti della microflora del terreno e dei vegetali superiori, si può, da questo punto di vista, essere relativamente tranquilli.

Circa la polluzione da grassi, oli minerali, idrocarburi non abbiamo rilevamenti diretti.

Nel corso delle nostre indagini non abbiamo avuto modo di rilevare fenomeni vistosi di un inquinamento del genere. Ma certo la possibilità esiste ed è anche abbastanza consistente.

E passiamo ai metalli pesanti. A parte la attualità del problema documentato dal notevole numero di lavori che giornalmente arricchisce la letteratura scientifica, il nostro Istituto si è dedicato a questo aspetto dell'inquinamento del suolo sulla base di alcune nostre constatazioni denuncianti contenuti decisamente abnormi di metalli pesanti in terreni prelevati in zone agricole, sempre della Lombardia, ma geograficamente lontane e soprattutto molto disperate come insediamenti industriali.

Dico subito che in tutte le indagini di cui riferisco, i metalli sono stati dosati mediante spettrofotometria in assorbimento atomico sull'estratto ottenuto trattando, all'ebollizione per 30', 10 g di terreno con 100 ml di HCl 6N.

Le quantità riscontrate non rappresentano quindi le quote immediatamente disponibili nè il contenuto totale, ma qualcosa di intermedio, l'aliquota cioè, che in un tempo più o meno lungo, può essere assimilata dalla vegetazione. Abbiamo scartato a priori l'uso di metodi che utilizzano reagenti più blandi, atti cioè a valutare la quota prontamente assimilabile, per diverse considerazioni. Prima di tutto perchè per ogni elemento e forse per ogni tipo di terreno avremmo dovuto scegliere un metodo diverso con il risultato quindi di complicare enormemente il lavoro analitico e, nello stesso tempo, di ottenere dei risultati non sempre rigorosamente confrontabili. In secondo luogo il

metodo da noi adottato ci offriva la possibilità di un esame sufficientemente rapido, capace peraltro di indicare la presenza o meno di quantità abnormi di metalli. Infine abbiamo ritenuto opportuno valutare la pronta assimilabilità dei metalli non con metodi prettamente chimici, ma attraverso il dosaggio degli elementi nella vegetazione raccolta in campo o fatta crescere in serra sui terreni in esame.

Il problema della contaminazione da metalli pesanti può essere visto sotto una angolazione più ampia che riguarda gli effetti di un accumulo di metalli pesanti nel terreno sullo equilibrio ambientale inteso come somma dei cicli biogeochimici di tutti gli elementi nutritivi; o sotto una angolazione più ristretta che considera precipuamente gli effetti tossici che i metalli pesanti presenti nel terreno in quantità abnormi possono determinare nelle piante e negli animali.

Noi ci siamo limitati in questa prima fase del nostro lavoro a studiare il problema da un punto di vista strettamente chimico agrario, prendendo cioè in considerazione il sistema suolo-pianta, sistema che peraltro rappresenta uno dei passaggi intermedi obbligati e forse il più importante dei cicli biogeochimici di cui si è detto.

Anche con questa limitazione, il problema è estremamente complesso per una serie di ragioni. In primo luogo, per la maggior parte degli oligo-elementi, lo scarto esistente tra la quantità necessaria perchè non si instaurino fenomeni di carenza e la quantità alla quale gli effetti tossici da eccesso cominciano a manifestarsi è molto piccolo.



Un'altra difficoltà è insita nel fatto che i metalli pesanti che pervengono dal terreno non rimangono allo stato ionico nelle soluzioni circolanti, ma seguono il destino dei corrispondenti ioni di origine geochimica già presenti nel terreno.

I metalli pesanti possono trovarsi infatti in varie forme: possono essere parte integrante dei reticoli cristallini o essere presenti come impurezza interstrato; essere presenti come precipitati semplici o complessi; come ioni inorganici semplici o complessi; come complessi organici solubili od insolubili; o addensati come cationi di scambio sulle superfici attive dei colloidi minerali e organici. Infine possono far parte di varie e complesse combinazioni delle associazioni di cui sopra.

Le radici delle piante, mediante l'energia derivante dalla respirazione, assimilano ioni metallici come tali o come chelati. Ma nel terreno nulla è statico e si modificano quindi in continuazione anche gli equilibri che regolano l'assimilabilità degli ioni metallici. Difatti l'insolubilità dei precipitati metallici contrasta la stabilità dei complessi metallici solubili; i precipitati insolubili di metalli allo stato di massima ossidazione vengono solubilizzati se si instaurano condizioni di ambiente riducente: alla flocculazione si oppone la deflocculazione, l'idratazione all'essiccamento, l'espansione delle lamine argillose e conseguente liberazione degli ioni all'avvicinamento delle lamine e conseguente intrappolamento degli ioni. La sostanza organica soggiace a mineralizzazione liberando i metalli a cui era precedentemente legata. D'altra parte l'incorporazione dei

metalli nella sostanza organica avviene a livello della microflora e della stessa pianta. I cationi adsorbiti sulle superfici attive dei colloidali sono in continuo interscambio con quelli presenti nelle soluzioni circolanti.

Ma nel caso specifico di un accumulo di metalli pesanti nel terreno i rapporti tra suolo e pianta sono resi ancora più complessi da un altro fattore; la presenza simultanea di più metalli. Credo che solo in casi assolutamente eccezionali si abbia una contaminazione da parte di un solo elemento. Noi, in tutte le indagini svolte, abbiamo sempre evidenziato la coesistenza nel terreno di più metalli: nei terreni del Milanese cromo,rame,piombo,zinco,nichel ; nel Bergamasco zinco,manganese e nichel ; infine nei terreni del Varesotto rame,cromo e nichel. Ne discende la possibilità di una interazione tra i singoli ioni sfociante a volte in fenomeni di antagonismo, a volte in fenomeni di sinergismo e la impossibilità, quindi, di estrapolare i risultati già acquisiti per ognuno degli elementi alle condizioni reali esistenti nei terreni oggetto di studio.

Per quanto concerne il passaggio dei metalli dal suolo alla pianta, Allaway (1968) che ha condensato moltissimi lavori sui cicli biogeochimici degli oligo-elementi, prospetta le seguenti possibilità : la pianta può svilupparsi e può giungere a maturità anche se contiene cobalto, cromo,rame, manganese e zinco in quantità insufficienti ai fabbisogni degli animali. La pianta può crescere normalmente, ma contenere selenio, cadmio,molibdeno e piombo a livelli tossici per gli animali. Le piante possono inoltre assorbire quantità minime di antimonio,arsenico,beril=

lio, cromo, mercurio, titanio, vanadio, nichel, zinco anche se presenti in forti quantità nel suolo. Infine è possibile che lo sviluppo della pianta cessi o venga drasticamente depresso prima che gli elementi tossici siano assorbiti dal suolo e accumulati in dosi tossiche per gli animali e per l'uomo. In quest'ultimo caso, quindi, il sistema suolo-pianta, attraverso la perdita o il ridotto sviluppo di quest'ultima, costituirebbe una barriera al passaggio degli elementi tossici negli animali. E in definitiva il danno alle colture verrebbe apportato dai metalli presenti nel terreno e non necessariamente dai metalli assimilati dalla pianta.

Delle molte indagini effettuate, mi limito a parlare di quelle condotte su terreni e foraggi prelevati in una zona irrigata dalla Vettabbia e in una ristretta area agricola nel Bacino del Margorabbia (in provincia di Varese).

#### Terreni irrigati con la Vettabbia.

Le acque della Vettabbia provengono dalla fossa interna di Milano e quindi dalla Martesana, dal Seveso e dal S.Mamete, (quest'ultimi intensamente inquinati da scarichi industriali); uscendo verso sud si spandono in zona Chiaravalle ed oltre ad irrigare coltivi, ma soprattutto marcite. Analizzate da Antoniani et al. (1932-1955) e successivamente da Gaito et al. (1960) sono risultate caratterizzate da un inquinamento sempre crescente. Successive analisi confermarono il loro spiccato grado di contaminazione ed una notevole variabilità attribuibile, molto probabilmente, alle pulsazioni di portata cui va incontro il Naviglio Martesana.

Inizio con la descrizione dei risultati ot

tenuti in una serie di indagini condotte in collaborazione con il Prof. Bellini dell'Istituto di Agronomia della nostra Facoltà su terreni e foraggi della marcita Pismonte irrigata con le acque del Vettabbia.

E' stato sottoposto ad analisi anche il terreno di due appezzamenti a frumento e di due a colture orticole: in ogni caso si è operato su sei campioni per appezzamento. Come terreno di controllo abbiamo utilizzato quello di un prato asciutto limitrofo alla marcita ed agli appezzamenti di cui sopra. A parte il caso di accumuli estremamente elevati indicatori di per sè di uno stato di sicura contaminazione, ritengo che, per una valutazione di un eventuale stato di inquinamento, sia indispensabile un raffronto con un terreno testimone il più vicino possibile, almeno per quanto riguarda il contenuto in microelementi di origine geochimica, ma sicuramente indenne da contaminazione. Con l'eccezione del piombo, e forse del nichel, di solito presenti in minime quantità, i metalli pesanti sono presenti infatti nei diversi terreni in quantità molto variabili e oscillanti tra limiti molto ampi in relazione alla matrice geologica ed all'andamento dell'evoluzione pedogenetica.

Per quanto concerne la possibilità di un confronto per le colture, bisogna distinguere: nel caso di una coltura singola, come ad esempio il mais, il grano, le colture orticole, il raffronto è possibile ove sia disponibile del materiale raccolto allo stesso stadio di sviluppo, ma su terreno sicuramente non inquinato. Per le foraggere il problema è più complesso perchè il raffronto sarebbe rigoroso solo se il testimone fosse perfettamente analogo come età del prato,

composizione floristica, numero di tagli e tipo e modalità dell'irrigazione ecc. , dato che le piante non solo assorbono i diversi ioni in misura diversa a seconda della specie, delle dimensioni, della velocità di crescita, dell'estensione e profondità delle radici, della velocità di traspirazione, dei fabbisogni nutritivi e così via, ma reagiscono altresì in modo diverso ai inquinanti in genere ed ai metalli in particolare.

Pur con tutte le riserve di cui sopra, abbiamo analizzato, in parallelo, campioni di erba di marcita e di erba del prato stabile asciutto. Per ogni taglio sono stati prelevati 6 campioni in ogni quadro di marcita e 6 nel prato asciutto. Con questo, lo ribadisco ancora una volta, non abbiamo voluto fare un confronto rigoroso tra contenuto in metalli dei due tipi di erba, confronto che non era possibile data la differenza, talvolta notevole, di composizione floristica, ma abbiamo voluto documentare almeno l'ordine di grandezza dei contenuti in foraggiere cresciute su terreno non contaminato.

Le figure 1-6 raccolgono i contenuti (media dei dati ottenuti sui 6 campioni di terreno prelevati nei singoli appezzamenti) nonché i valori ottenuti mediante le medie dei dati riscontrati nei singoli campioni di foraggiere prelevate il 30 maggio, il 27 giugno, il 25 luglio, il 31 agosto e il 4 ottobre 1973. Gli istogrammi delle figure 7-12 si riferiscono invece ai dati (media dei valori ottenuti su sei campioni) relativi a tutti gli 8 sfalci effettuati nell'arco di un anno : l'istogramma pieno è il testimone, e i tre successivi rappresentano il contenuto dei foraggi prelevati nell'ordine nel I-II-III quadro di marcita.

L'esame dei singoli valori analitici ottenuti sul terreno consente le seguenti considerazioni :

CROMO - I terreni della marcita sono risultati fortemente contaminati da cromo; nonostante che le deviazioni dei singoli valori della media siano abbastanza ampie, i dati sono largamente significativi rispetto al testimone che denuncia un contenuto medio in cromo del suolo di 60 ppm. Secondo Allaway (1968) il contenuto medio in cromo totale del suolo è di 100 ppm con punte minime di 5 e massime di 3000 ppm, registrato peraltro in terreni serpentinosi.

Nei terreni a frumento è stata riscontrata una concentrazione in cromo, solo leggermente, ma significativamente superiore al testimone. In pratica nessuna differenza è stata osservata tra quest'ultimo e i terreni ad orto.

RAME - Sia i terreni a marcita che i terreni a frumento sono risultati significativamente più ricchi di rame del terreno testimone. Al contrario non sono stati trovati incrementi di rilievo nei terreni ad orto. La letteratura dà per il terreno un contenuto medio di 20 ppm con punte minime di 2 e massime di 100 ppm, che, secondo alcuni AA, possono giungere a 500 ppm.

ZINCO - Questo metallo rappresenta uno dei più diffusi e presenti in maggior quantità.

Ci troviamo infatti di fronte a contenuti di 2400 (I quadro), 1880 (II quadro), 2370 (III quadro) ppm contro un valore di 210 ppm del testimone, valore che rientra perfettamente nei limiti previsti dalla letteratura (valore medio 50 minimo 10 - massimo 300 ppm).

Anche negli altri terreni lo zinco è risul

tato presente in quantità significativamente più elevate rispetto al testimone.

NICHEL - I terreni dei tre quadri di marcita sono risultati significativamente contaminati da nichel; valori praticamente uguali e leggermente inferiori al testimone sono stati registrati invece, rispettivamente, nei terreni a frumento e in quelli a orto.

MANGANESE - In contrasto con quanto osservato in indagini preliminari, per il manganese non sembra accertato un accumulo.

A parte il terreno del II quadro della marcita, in cui il manganese è risultato leggermente superiore a quello del testimone, gli altri terreni sono apparsi infatti praticamente normali.

PIOMBO - Notevole è risultata la contaminazione da piombo di tutti i terreni esaminati. Siamo di fronte a cifre cospicue 1488 - 893 - 1350 ppm nei tre quadri di marcita, vale a dire 10-15 volte più del testimone e circa 5 volte più del contenuto considerato come massimo nel terreno (200 ppm).

Anche negli altri terreni, a frumento e a orto, il piombo è presente in quantità nettamente superiori al testimone, ma, ovviamente, non paragonabili a quelle riscontrate nella marcita.

Per quanto concerne i foraggi, le cui caratteristiche sono elencate nel prospetto allegato, le medie annuali del contenuto in cromo denunciano nelle foraggere cresciute sul terreno inquinato un contenuto leggermente più elevato di quello trovato nelle foraggere considerate come testimone. Tale differenza si manifesta peraltro unicamente nei tagli invernali ed

è tanto più significativa se si considera che in detti prelievi le foraggere considerate co me testimonio sono state prelevate in un prato ordinario irriguo (acqua della Vettabbia) e non nel prato asciutto dove, per ovvie ragioni, non vi era disponibilità di erbe.

Per il rame la media annuale dà valori di 36,33, e di 29 (rispettivamente nei tre quadri di marcita) leggermente superiori a quelli riscontrati nel testimone (25). Analogamente a quanto riscontrato per il cromo, tale divario si manifesta in sostanza a partire da V prelievo (1° erba autunnale) e si accentua nel VI e nel VII (dicembre e gennaio). Deve essere rilevato peraltro che anche la media annuale del testimone è leggermente superiore alla soglia di 20 ppm oltre la quale si dovrebbero manifestare sintomi di fitotossicità. Certo per il ra me è difficile parlare di soglia quando la dose essenziale è di 2-4 ppm, la dose normale è di 4-15 ppm e la fitotossicità si dovrebbe manifestare già a concentrazioni superiori a 20 ppm.

Per lo zinco la media annuale è notevolmente più elevata nelle foraggere cresciute nel terreno contaminato (226-225-220- ppm rispettivamente nel I, II, III quadro) contro un contenuto di 140 ppm riscontrato nel testimone. La differenza tra i due tipi di foraggere è sensibile anche nei tagli estivi e si accentua nei tagli invernali. Poichè vi è un sensibile diva rio tra quella che è considerata la dose essenziale (8-15 ppm) e quella a cui si manifestano i primi sintomi (200 ppm) i nostri rilevamenti appaiono degni di molta attenzione.

Il contenuto in nichel è risultato mediamente di poco superiore al testimone, ma netta



mente al di sotto della soglia di tossicità. E' proprio per il nichel peraltro che deve essere preso in particolare considerazione quanto è stato accennato in precedenza circa la possibilità che lo sviluppo della pianta cessi o venga fortemente depresso senza che il nichel venga assimilato in dosi eccessive. Molto preziose a questo riguardo sono le osservazioni di diversi AA. che hanno a lungo sperimentato su suoli ricchi di serpentino giungendo alla conclusione che la mancanza di fertilità di detti suoli è dovuta alla presenza di quantità eccessive di cromo e soprattutto di nichel. Da questi lavori è emersa altresì l'influenza negativa che il nichel in particolare e i metalli pesanti in generale hanno sull'assorbimento e la traslocazione del ferro e sulla biogenesi della clorofilla con il conseguente instaurarsi di fenomeni di clorosi.

Per il manganese è stata fatta un'osservazione molto interessante. Mentre in indagini più accurate non sono stati confermati i dati preliminari circa un presunto accumulo di manganese nel terreno, i valori ottenuti sui foraggi denunciano un contenuto in manganese (32-30-32 ppm rispettivamente nel I, II, III quadro) che è circa la metà di quello registrato nei testimoni e inferiore alla soglia essenziale.

E' lecito quindi postulare che siano proprio i metalli pesanti, presenti in quantità eccessive nel terreno, ad abbassare l'assimilabilità del manganese. Sarebbe questa una delle possibili conseguenze dell'inquinamento da metalli pesanti del suolo. In altri termini, si potrebbe giungere al paradosso di avere fenomeni di carenza di un microelemento essenziale come il manganese, presente nel terreno in quantità sufficienti

ti o anche eccessive, ma reso non assimilabile dalla presenza contemporanea di dosi eccessive di altri microelementi.

Per il ferro, che pure ha un comportamento assai simile al manganese, sia nel suolo che nella pianta, non abbiamo avuto dati così probanti anche in prove di assimilabilità condotte in serra secondo Neubauer.

Per quel che concerne il piombo, ci troviamo di fronte ad una media annuale di 46-39-44 ppm rispettivamente nel I, II, III quadro rispetto a 25 ppm del testimone. Il divario si palesa unicamente nelle foraggere dei tagli invernali.

Sembra quindi accertato che il foraggio jemale sia più ricco di metalli pesanti e in quanto tale sia potenzialmente più tossico per gli animali. Questo potrebbe giustificare il fatto che i casi più gravi di intossicazione sono stati quasi sempre riscontrati a seguito di alimentazione con erbe invernali.

Il maggior accumulo nei foraggi jemali può essere imputato ad un assorbimento dei metalli direttamente dall'acqua; ovvero ad un più prolungato contatto tra radici e terreno essendo la vegetazione epigea rallentata per effetto termico. Peraltro il mancato accumulo di metalli pesanti nella parte aerea nel periodo primaverile estivo non significa necessariamente che l'alimentazione con tale erba non sia dannosa per altre ragioni quali squilibri di macro e microelementi nutritivi. Anche in questo senso contiamo di sperimentare così come contiamo di approfondire le indagini sul contenuto in metalli del grano e degli ortaggi cresciuti su terreni contaminati. Abbiamo già qualche dato preliminare, ma prima di pronunciarci vogliamo disporre di

rilievi che ci consentano deduzioni più probanti di quelle cui finora siamo pervenuti.

Possiamo invece dare qualche notizia su altre indagini condotte al fine di chiarire se l'intero comprensorio della Vettabbia fosse contaminato o se la cascina Pismonte rappresentasse un caso anomalo e sporadico.

L'area presa in considerazione ha una estensione di circa 10.500 pertiche milanesi pari a circa 700 ettari; di questi il 37% è coltivato a marcita (3900 p.m.), l'11,2% a prato stabile (1180 p.m.) ed il 45% (4000 p.m.) a seminativi irrigui. La differenza a 100 è a orti e a colture avvicendate. Dai seminativi irrigui è escluso il frumento.

I risultati ottenuti sono schematizzati nei grafici 13 - 17. In essi le superfici circolari sono proporzionali ai contenuti in metalli riscontrati nei terreni di prati marcitoi appartenenti alle cascine indicate nel prospetto che segue. In esso figurano altresì i valori analitici riscontrati e schematizzati nei grafici di cui sopra.

Il N° 1 relativo alla Cascina di Sesto Uteriano può essere considerato un testimone relativo in quanto irrigato dal Cavo Nosedo che riceve le acque della Vettabbia diluendole notevolmente.

I valori riscontrati dimostrano inequivocabilmente che l'intera zona è contaminata.

COMPRENSORIO DEL VETTABBIA

Valori riferent<sup>e</sup>si ai primi 10 cm (marcita)

Cascina	N°	Cr	Cu	Ni	Zn	Pb
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Sesto Ulteriano	1	100	40	22	200	50
Salvanesco	3	1400	1900	136	5100	1700
Guinzana	4	233	500	48	1025	700
Gerola	5	395	930	63	1750	1250
Pismonte	6	550	675	66	2290	1100
Nosedo	7	550	825	65	1675	1320
Mulino del.Valle	8	400	900	66	2675	1500
Ambrosiana	9	575	1400	75	2450	1800
Macconago	10	550	925	90	3150	1500

Terreni prelevati in provincia di Varese.

Nel corso di una vasta indagine pluridisciplinare sul bacino idrografico del Margorabbia, il nostro Istituto, che ha svolto la parte attinente il chimismo delle acque superficiali e profonde, ha avuto modo di effettuare alcuni rilevamenti che s'inseriscono perfettamente nel quadro delle indagini sull'inquinamento da metalli pesanti di terreni agricoli.

Nel valutare l'influenza degli scarichi domestici ed industriali sulla qualità delle acque del fiume Margorabbia è stato osservato che gli unici parametri anomali erano talvolta i contenuti in metalli. E' pur vero che i valori riscontrati nel fiume non erano mai di tale entità da indicare un suo stato di permanente compromissione; tuttavia la presenza di quantità dosabili di rame, nichel e cromo, non giustificate dalla litologia della zona, testimoniavano un inquinamento da scarichi industriali. Un esame

approfondito della situazione ci ha permesso di individuare uno scarico industriale che viene immesso in un affluente del Margorabbia: il Rancina. I dati analitici in esso riscontrati evidenziano contenuti di Cu, Cr e Ni, variabili entro limiti assai ampi, ma largamente superiori ai limiti di accettabilità degli scarichi oggi riconosciuti.

Detto scarico non altera la qualità del fiume per l'elevato rapporto di diluizione esistente tra scarico e corpo recipiente e tra questo ultimo ed il fiume Margorabbia. Risulta invece grave l'effetto di accumulo di questi metalli nel terreno di una marcita irrigata dal Rancina. Tale marcita è in parte degradata e viene utilizzata prevalentemente come prato pascolo e come marcita vera e propria solo sporadicamente.

Alcuni rilevamenti preliminari sul contenuto nel terreno dei tre metalli sopradetti ci hanno indotto ad approfondire lo studio anche perchè il proprietario della marcita che ha una stalla di 150 capi si lamenta di gravi disturbi, talvolta anche mortali, che i suoi animali accusano dopo l'ingestione dei foraggi della marcita. E poichè, a differenza delle acque del Vettabbia ricche di ogni genere di inquinanti, le acque del Rancina sono contaminate unicamente da metalli, questa marcita ci è sembrata la sede ideale per studiare i possibili effetti sugli animali di questo tipo di inquinazione.

Ma restiamo al terreno. Il grafico 18 raccoglie i risultati analitici ottenuti su una serie di campioni superficiali prelevati nel 1973 a diversa distanza dall'immissione dell'acqua.

In detto grafico ogni superficie circolare rappresenta il carico inquinante totale dei tre

metalli ed è a sua volta suddivisa in settori la cui area è proporzionale alla quantità dei singoli metalli. Dall'esame del grafico risulta con netta evidenza la rispondenza tra accumulo dei metalli e distanza tra punti di prelievo e punti di immissione dell'acqua.

I metalli si accumulano nello strato superficiale. I risultati ottenuti su campioni prelevati in punti immediatamente adiacenti nello strato 0-5 e nello strato 0-30 (grafici 19-21) dimostrano che i metalli, nell'ordine : rame più del cromo; cromo più del nichel, si accumulano allo strato 0-5 cm.

Il controllo analitico effettuato su molti terreni della zona ci ha permesso di delimitare la parte inquinata. Su di una superficie agraria di 128 Ha, 28 sono irrigati dal Margorabbia e 9,5 dal Rancina. Di questi ultimi sono risultati nettamente compromessi solo 0,4 ettari, leggermente contaminati 3 ettari.

Ma il più interessante rilievo da noi effettuato è la differenza emersa tra i dati di contenuto in metalli registrati nel 1973 e quelli riscontrati, esattamente negli stessi punti di prelievo, nel 1974 (tab.1).

A mio avviso, una possibile esplicazione di questo fenomeno può essere la seguente: come è stato accennato in precedenza, i contenuti in metalli dello scarico industriale sono molto variabili. La tabella 2 comprende il contenuto in metalli dello scarico, la portata dello scarico e del corpo recipiente nonchè le quantità in mg di metalli che lo scarico versava, ogni secondo, nel Rancina, al momento dei diversi prelievi (6 nell'arco di un anno).

Dall'esame della tabella risulta evidente

che non solo i valori assoluti, ma anche i rapporti tra i diversi metalli sono molto variabili, in relazione, evidentemente, alle lavorazioni industriali in atto. Di conseguenza, da momento a momento, varia sensibilmente la quota dei singoli metalli che perviene al terreno e si modificano di continuo anche i rapporti tra i diversi metalli già presenti.

In altri termini, l'inquinamento appare non un fenomeno statico ma, al contrario, estremamente dinamico in relazione ai nuovi apporti di metalli che possono -direi per azione di massa- spostare i metalli preesistenti fino ad eliminarli nelle acque di drenaggio. Se questa nostra supposizione si rivelerà valida, ci troveremo di fronte a conseguenze senz'altro più gravi di quelle previste e che riguardano la catena suolo-pianta animale-uomo. Sarà infatti documentato il meccanismo dell'inquinamento delle acque di falda, ripetutamente evidenziato in Lombardia.

Per quanto concerne il passaggio nei vegetali, i primi dati hanno dimostrato una certa corrispondenza tra contenuto del terreno e con tenuto dei foraggi. Per chiarire meglio questo aspetto del problema, abbiamo delimitato 4 parcelle di un m<sup>2</sup> in un terreno inquinato e altre 4 in un terreno non contaminato. In ognuna delle parcelle è stata raccolta l'erba, sono state classificate le specie principali e quindi determinato il contenuto in Cu, Cr e Ni sui campioni rappresentativi delle diverse specie. Sul materiale prelevato nelle 4 parcelle inquinate è stata determinata altresì la sostanza secca che non è stata valutata in quelle di controllo per l'eccessiva presenza di infestanti.

I dati ottenuti raccolti nelle tabelle 3-

4-5 dimostrano :

- 1) una netta differenza tra terreno inquinato e terreno testimone sia per quanto riguarda il contenuto in metalli sia per quanto concerne la loro distribuzione lungo il profilo.
- 2) il contenuto in metallo delle foraggere cresciute nel terreno contaminato è superiore a quello delle foraggere di controllo.
- 3) rapportando il contenuto delle foraggere a quello in metalli del terreno (strato 0-25 cm.) si rileva che, in proporzione, il nichel è assorbito in misura maggiore, seguito dal rame e quindi dal cromo.
- 4) il confronto tra i dati registrati nelle graminacee e nelle infestanti, inquinate e non, dimostra che le graminacee assorbono meno delle infestanti, nonostante che le loro radici si sviluppino più superficialmente e quindi nello strato più ricco in metalli. Ciò sta a confermare le osservazioni di diversi AA. (Terkeltoub R.W., 1971 - Kabata Pendias A., 1971 - Kabata Pendias A., 1972 - Warren H.W. et al., 1971 - Warren H.W., 1972 - Chisholm D., 1972 - Ter Haar G., 1970 - John M.K., 1972 - John M.K. et al. 1972) secondo i quali l'assorbimento è strettamente correlato alle caratteristiche fisiologiche delle diverse specie più che alla lunghezza e al tipo dell'apparato radicale.



### CONCLUSIONI

L'inquinamento da metalli pesanti di alcuni terreni irrigui della Lombardia è un fatto inconfutabile. Non sempre esso è localizzato in zone fortemente industrializzate: casi di contaminazione sono stati constatati infatti anche là dove una sola industria immette un suo scarico in un corpo idrico utilizzato successivamente ai fini irrigui. Nei due casi -massiccio insediamento industriale o unica industria- l'inquinamento è della stessa entità: quella che è sostanzialmente diversa è la superficie interessata al fenomeno.

Le nostre constatazioni, lungi dal concludere un discorso, pongono sul tappeto una serie di problemi e di interrogativi, sia per quanto riguarda gli effetti sull'uomo e sugli animali di una alimentazione con prodotti contenenti quantità abnormi di metalli, sia per quel che concerne i possibili effetti di un tale accumulo sulle proprietà chimiche, nutrizionali e biologiche del suolo.

Per quanto concerne l'aspetto strettamente pedologico, è lecito presumere che, anche se lo assorbimento dei metalli avviene attraverso molteplici meccanismi, esso porti anche ad una sostanziale modificazione del complesso di scambio, la cui importanza, ai fini della nutrizione vegetale, è ben nota. Ne discende che la sostituzione, nel complesso di scambio, di calcio, magnesio, potassio e ammonio con metalli pesanti può provocare il passaggio in soluzione degli elementi di cui sopra e conseguentemente la loro perdita per dilavamento. Alcune prove che stiamo conducendo in tal senso confermano que-

sta supposizione. E' troppo presto peraltro per dire qualcosa di certo.

Inoltre è evidente che la capacità assorbente del terreno ha un limite, superato il quale gli elementi metallici restano in soluzione, in condizioni, quindi, di una più rapida assimilabilità da parte della pianta e di conseguenza con più spiccati effetti fitotossici. Ovvero - e questo è forse la conseguenza più temibile - i metalli, non più assorbiti dal suolo e presenti nelle soluzioni circolanti in quantità superiori alla capacità di assimilazione delle colture, possono essere dilavati andando ad inquinare le acque sotterranee. Questa ipotesi è del resto in parte suffragata dai rilevamenti sperimentali cui è stato, in precedenza, accennato.

Per quanto concerne l'effetto dei metalli pesanti sulle colture abbiamo in corso esperienze in serra intese a studiare la loro assimilabilità da parte dei vegetali. I dati finora acquisiti starebbero a dimostrare che i metalli, più che esercitare effetti fitotossici diretti, agiscono sull'assimilabilità o la dislocazione degli elementi macronutritivi.

Infine, per quanto concerne il loro effetto sull'attività biologica del suolo, i primi risultati ottenuti in prove di nitrificazione condotte su terreno inquinato artificialmente con dosi crescenti dei singoli metalli dimostrano che nessuno degli elementi finora sperimentati (Pb - Cu - Zn ) annulla per intero il potere nitrificante, anche se aggiunto in quantità decisamente elevate (4 m.e. per 20 g di terreno). Essi deprimono peraltro la formazione dei nitrati a partire da una soglia di 0,5 m.e. per 20 gr che corrisponde alle concentrazioni piuttosto elevate, di 2600 ppm di piombo, di 795 di rame e 820 di zinco.

BIBLIOGRAFIA

- Allaway W.H. (1968)- Advances in Agronomy- 20 , 235.
- Antoniani C., Sudario E., Vianello (1932)-Lab.Chim. Agr., R.Ist.Sup.Agr. "A.Ponti"- 19, 1.
- Antoniani C., Chiaravalli G., Forti G., Monzini A. (1955) - Ann.Fac.Agraria, Nuova Serie- 6 , 7.
- Catelani D., Vandoni M.V.(1974)- Riv.Ital.Sostanze Grasse- 51 , 13.
- Chisholm D.(1972)- Can.J.Plant Sci.- 52 , 583.
- Crooke W.M., Hunter J.G., Vergnano O. (1954)- Ann.Appl.Biol.- 41 , 311.
- Edwards C.A.(1966)-Residue Reviews-13 , 83.
- Fusi P., Corsi R. (1968)-Agrochimica- 12 , 109.
- Fusi P., Corsi R. (1969)-Agrochimica- 13 , 44.
- Gaito G., Nespoli F., Scotti C. (1960)- Le Acque Superficiali a Milano"Quaderni della Città di Milano" Ediz.Comune di Milano.
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V. (1965)-Chimica- 41 , 403.
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V., Garoia V. (1966)- Chimica - 42 , 293.
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V., Garoia V. (1967)- Chimica - 43, 169.
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V., Garoia V. (1969)- Chimica - 45 , 78.
- Gorieri Scalaffa P., Goldberg Federico L.(1966) -Chimica-42 , 136.
- Hunter J.G., Vergnano O.(1952)- Ann.Appl.Biol.- 39 , 279.
- Hunter J.G., Vergnano O.(1953)- Ann.Appl.Biol.- 40 , 761.
- Isvet (1969)-Documento N° 30 "Inquinamento ed Agricoltura"-
- John M.K.(1972)-J.Environ. Quality- 1 , 295.

- John M.K., Van Laerhoven C. (1972)-J. Environ. Quality- 1 , 169.
- Kabata Pendias A. (1971)-Pamietnik Pulawski-45 , 127.
- Kabata Pendias A. (1972)-Pamietnik Pulawski-55 , 61.
- Kanitz S., Castello G. (1967)- "Giornate Fito=patologiche" Bologna-
- Malquori A., Radaelli L. (1966)- Ric.Sci.- 36 , 1094.
- Malquori A., Radaelli L. (1967)- L'Italia Agri.-104 , 1.
- Malquori A., Fusi P., Staccioli G. (1966)-Chimica e Industria - 49 , 279.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.) (1966) Meeting on Research on the Unintentional Occurrence of Pesticides in the Environments, Parigi.
- Paccagnella B., Prati L. (1971) 2° Sachia " I Pesticidi in Agricoltura "-Bari-.
- Petrosini G., Tafuri F., Businelli M. (1968) -A=agrochimica- 12 , 422.
- Petrosini G., Tafuri F., Businelli M. (1970) -A=agrochimica - 14 , 123.
- President's Science Advisory Comitee, Restoring the Quality of our Environment, Rept. of the Enviromental Pollution Panel (1965).
- Radaelli L., Fusi P. (1968)-Agrochimica -12, 558.
- Rennie D.A. (1966)-Background Paper C 22-3, Canadian Council of Resource Ministers Pollution and our Enviroment- A National Conference-.
- Ter Haar G. (1970)- Enviromental Science Technology - 4 , 226.
- Terkeltoub R.W. (1971)-Water Resources Research - 7 , 704.

- Vandoni M.V. (1968) -Chimica- 44, 10.  
Vandoni M.V., Goldberg Federico L. (1969) -Chimica- 45 , 86.  
Vandoni M.V., Goldberg Federico L. (1973)-Riv. Ital.Sostanze Grasse- 50 , 185.  
Vandoni M.V., Goldberg Federico L. (1973)-Riv. Ital.Sostanze Grasse- 50 , 357.  
Warren H.V. ,Delavault R. E.,Fletcher K.,Wilks E. (1971) - Reprinted from Trace Substances in Enviromental Health IV°, University of Missouri.  
Warren H.V., (1972)-Papers Submitted to the 22° International Geographical Congress,Canada-.  
Wheatley G.A., Hardman J.A.,Strikland C.(1962) - Plant Pathology- 11 , 81.

Caratteristiche dei foraggi  
della Cascina Pismonte.

Marcita

Controllo

Prelievo 30 maggio 1973

I quadro-erba agostana di  
marcita costituente l'incipiente  
ricaccio del  
maggenghino. fieno maggongo  
di prato stabile  
asciutto.

II quadro-erba maggenghina.

III quadro-fieno maggenghino  
raccolto durante  
il suo affienamento.

Prelievo 18 luglio 1973

I quadro-erba agostana di  
marcita. erba agostana  
di prato stabile  
asciutto (a  
pena falciata.

II quadro-erba agostana di  
marcita.

III quadro-erba agostana di  
marcita.

Marcita

Controllo

Prelievo 25 luglio 1973

- I quadro-erba terzuola erba terzuola di  
prato stabile a=  
sciutto pronta  
per il taglio.
- II quadro-erba terzuola
- III quadro-erba terzuola

Prelievo 31 agosto 1973

- I quadro-incipiente ricacio  
del taglio  
quartirolo. erba quartirola  
(prossima al ta=  
taglio)di prato sta  
bile asciutto.
- II quadro-erba quartirola  
appena tagliata.
- III quadro-erba quartirola  
pronta per il  
taglio.

Prelievo 4 ottobre 1973

- I quadro-prima erba autunnale  
pronta per  
il taglio. erba di prato sta  
bile asciutto.
- II quadro-prima erba autunnale  
pronta per  
il taglio.
- III quadro-prima erba autunnale  
pronta per  
il taglio.

Marcita

Controllo

Prelievo 6 dicembre 1973

- I quadro-seconda erba autun-  
nale pronta per il  
taglio. Lolium italicum  
raccolto sul  
prato stabile  
irriguo a lato  
del II quadro  
(irrigato con  
la Vettabbia).
- II quadro-seconda erba autun-  
nale pronta per il  
taglio.
- III quadro-seconda erba autun-  
nale pronta per il  
taglio.

Prelievo 19 gennaio 1974

- I quadro-prima erba primave-  
rile (Lolium itali-  
cum e mazzucchello) ricaccio prato  
stabile a segui-  
to innalzamento  
termico e piog-  
ge costituito  
da Lolium ita-  
licum.
- II quadro-prima erba primave-  
rile (Lolium itali-  
cum e mazzucchello)
- III quadro-prima erba primave-  
rile (Lolium itali-  
cum e mazzucchello)



Marcita

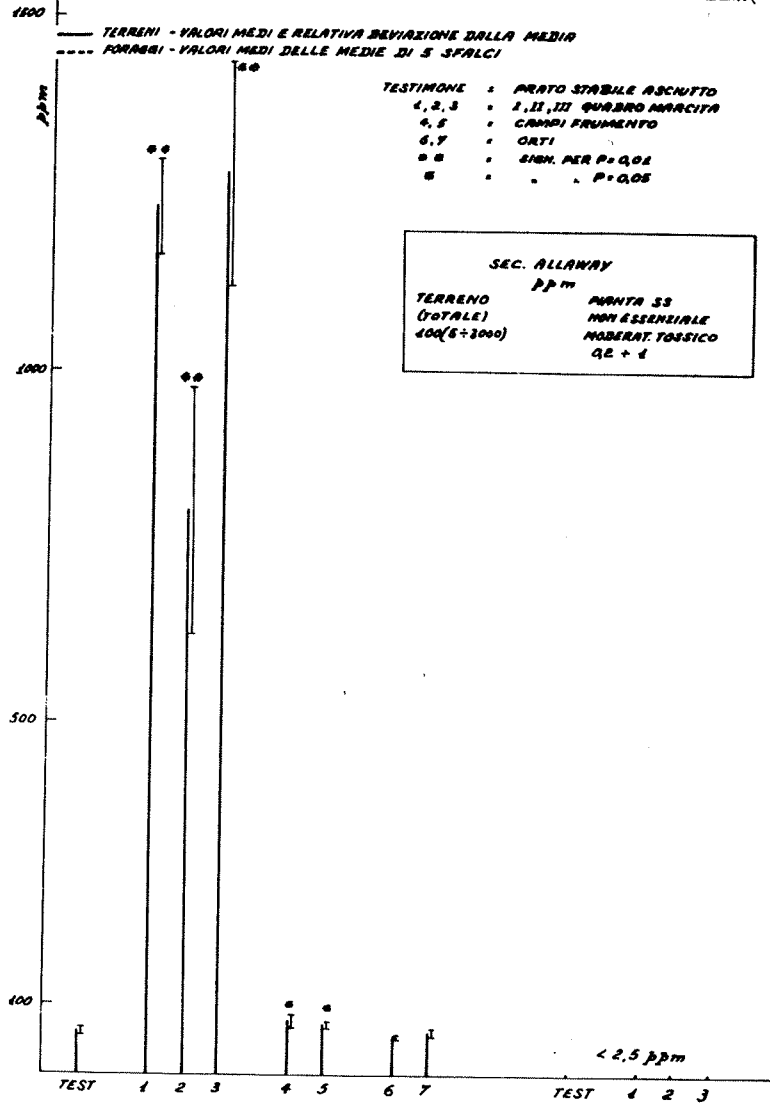
Controllo

Prelievo 23 febbraio 1974

- I quadro-prima erba primave  
rile pronta per il  
taglio costituita  
prevalentemente da  
*Lolium italicum*.
- Erba maggenga  
all'inizio del  
ricaccio (prato  
stab. asciutto)  
*Lolium italicum*  
e *Poa pratensis*.
- II quadro-prima erba primave  
rile pronta per il  
taglio costituita  
prevalentemente da  
*Lolium italicum*.
- III quadro-prima erba primave  
rile pronta per il  
taglio costituita  
prevalentemente da  
*Lolium italicum*.

**GRAFICO 1**

CONTENUTI IN CROMO DI ALCUNI TERRENI E FORAGGI IRRIGATI DALLA VETTABIA (CASA PISMONTE)

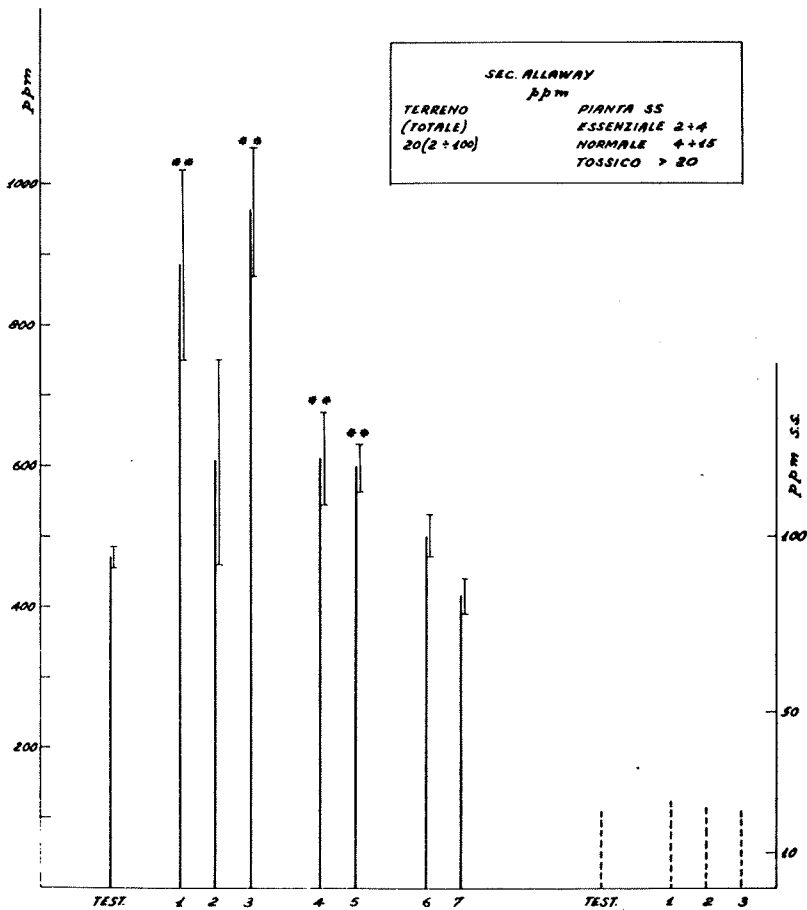


**GRAFICO 2**

CONTENUTI IN RAME DI ALCUNI TERRENI E FORAGGI IRRIGATI DALLA VETTABIA (S. P. MONTE)

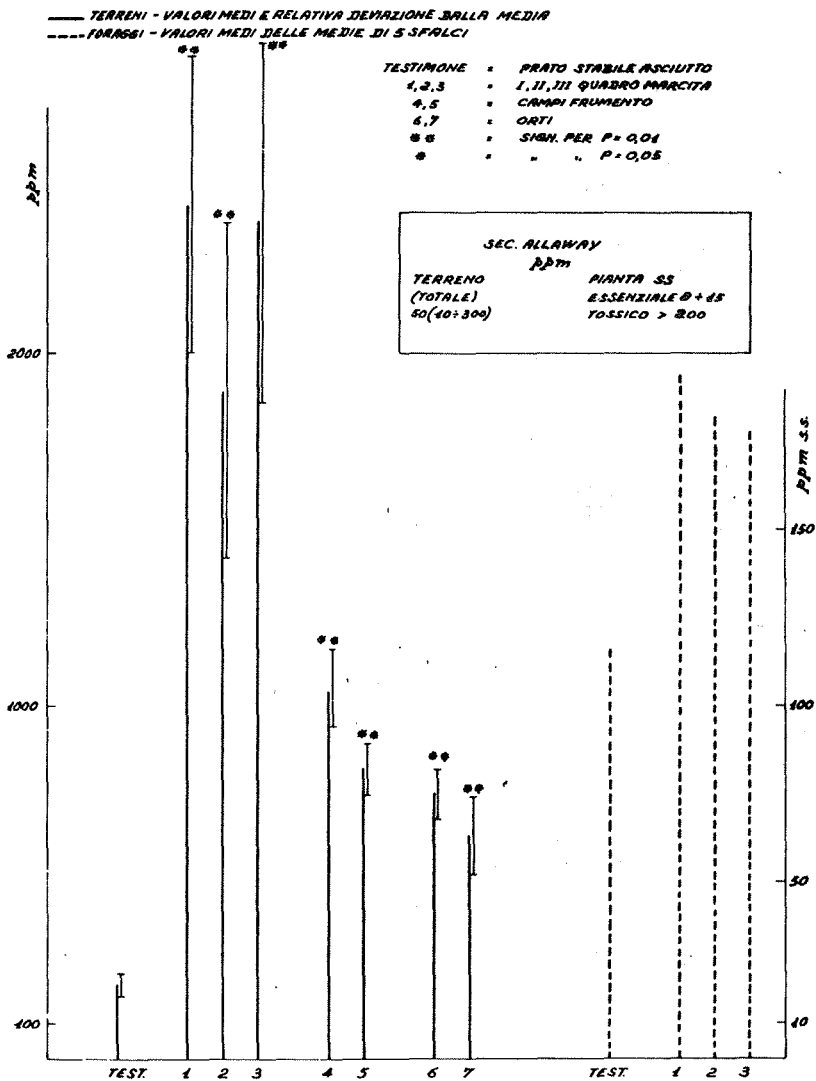
— TERRENI. VALORI MEDI E RELATIVA DEVIATIONE DALLA MEDIA  
 - - - FORAGGI. VALORI MEDI DELLE MEDIE DI 5 SFALCI

TESTIMONE : PRATO STABILE ASCIUTTO  
 1, 2, 3 : I II III QUADRO MARCIA  
 4, 5 : CAMPI FRUMENTO  
 6, 7 : ORTI  
 \*\* : SIGN. PER P = 0,01  
 \* : " " P = 0,05



**GRAFICO 3**

**CONTENUTI IN ZINCO DI ALCUNI TERRENI E FORAGGI IRRIGATI DALLA VETTABIA (Cas. PISMONTE)**

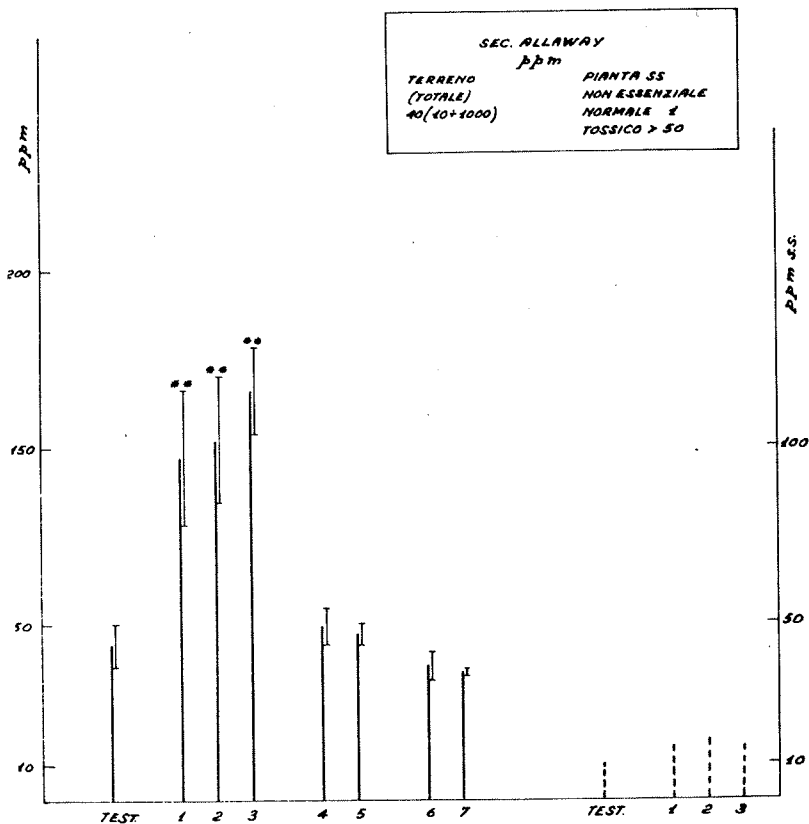


**GRAFICO 4**

**CONTENUTI IN NICHEL DI ALCUNI TERRENI E FORAGGI IRRIGATI DALLA VETTABBIA**  
(Cas. PISMONTE)

— TERRENI - VALORI MEDI E RELATIVA DEVIATIONE DALLA MEDIA  
 ---- FORAGGI - VALORI MEDI DELLE MEDIE DI 5 SPALCI

TESTIMONE \* PRATO STABILE ASCIUTTO  
 1, 2, 3 : I, II, III QUADRO MARCITA  
 4, 5 : CAMPI FRUMENTO  
 6, 7 : ORTI  
 \*\* : SIGN. PER P = 0,01  
 \* : " " P = 0,05



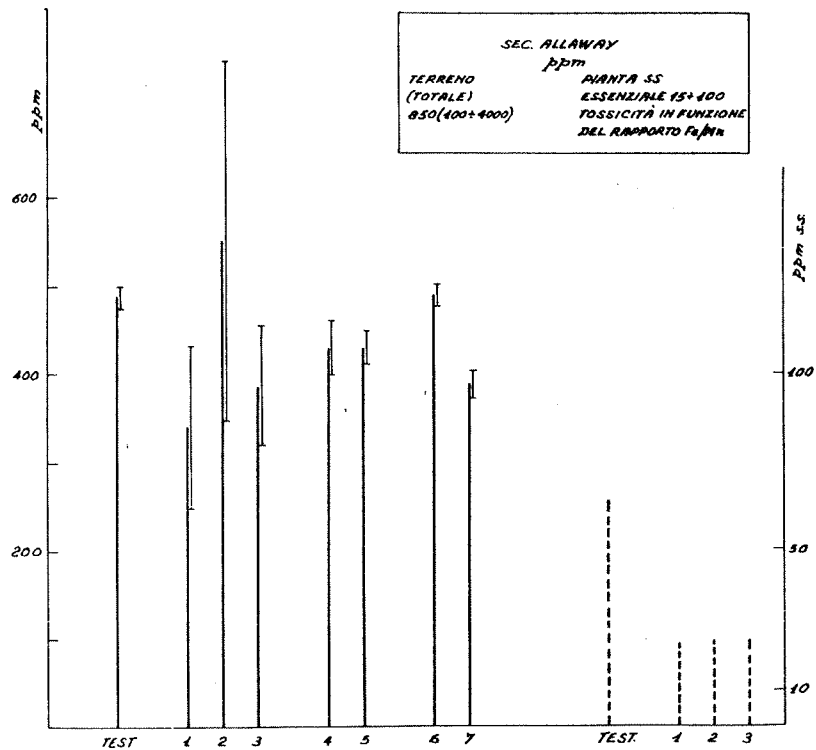
**GRAFICO 5**

CONTENUTI IN MANGANESE DI ALCUNI TERRENI E FORAGGI IRRIGATI DALLA VETTABBIA

(cas. PISMATE)

— TERRENI - VALORI MEDI E RELATIVA DEVIAZIONE DALLA MEDIA  
 ---- FORAGGI - VALORI MEDI DELLE MEDIE DI 5 SFALCI

- TESTIMONE = PRATO STABILE ASCIUTTO  
 1, 2, 3 = I, II, III QUADRO MARCITA  
 4, 5 = CAMPI FRUMENTO  
 6, 7 = ORTI  
 \* \* = SIGN. PER P=0,01  
 • = " " P=0,05

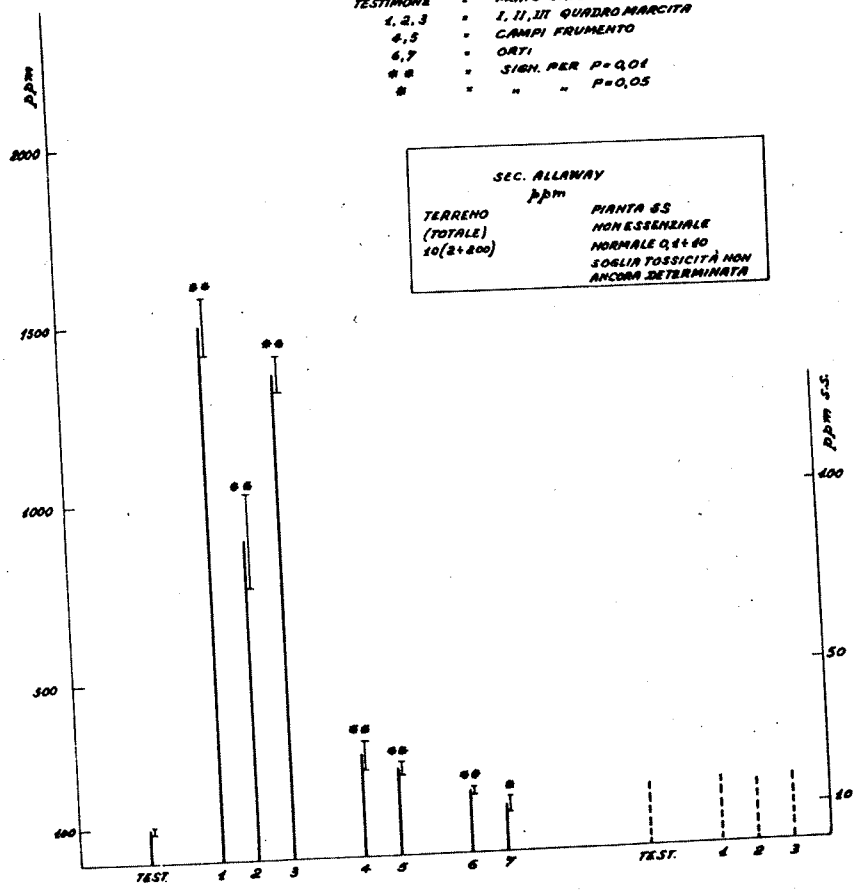


**GRAFICO 6**

**CONTENUTI IN PIOMBO DI ALCUNI TERRENI E FORAGGI IRRIGATI DALLA VETTABBIA (Cas. PISMONE)**

— TERRENI - VALORI MEDI E RELATIVA DEVIAZIONE DALLA MEDIA  
 - - - FORAGGI - VALORI MEDI DELLE MEDIE DI 5 SFALCI

- |           |   |                           |
|-----------|---|---------------------------|
| TESTIMONE | * | ARATO STABILE ASCUTTO     |
| 1, 2, 3   | * | I, II, III QUADRO MARCITA |
| 4, 5      | * | CAMPI FRUMENTO            |
| 6, 7      | * | ORTI                      |
| **        | * | SIGN. PER P=0,01          |
| #         | * | " " P=0,05                |



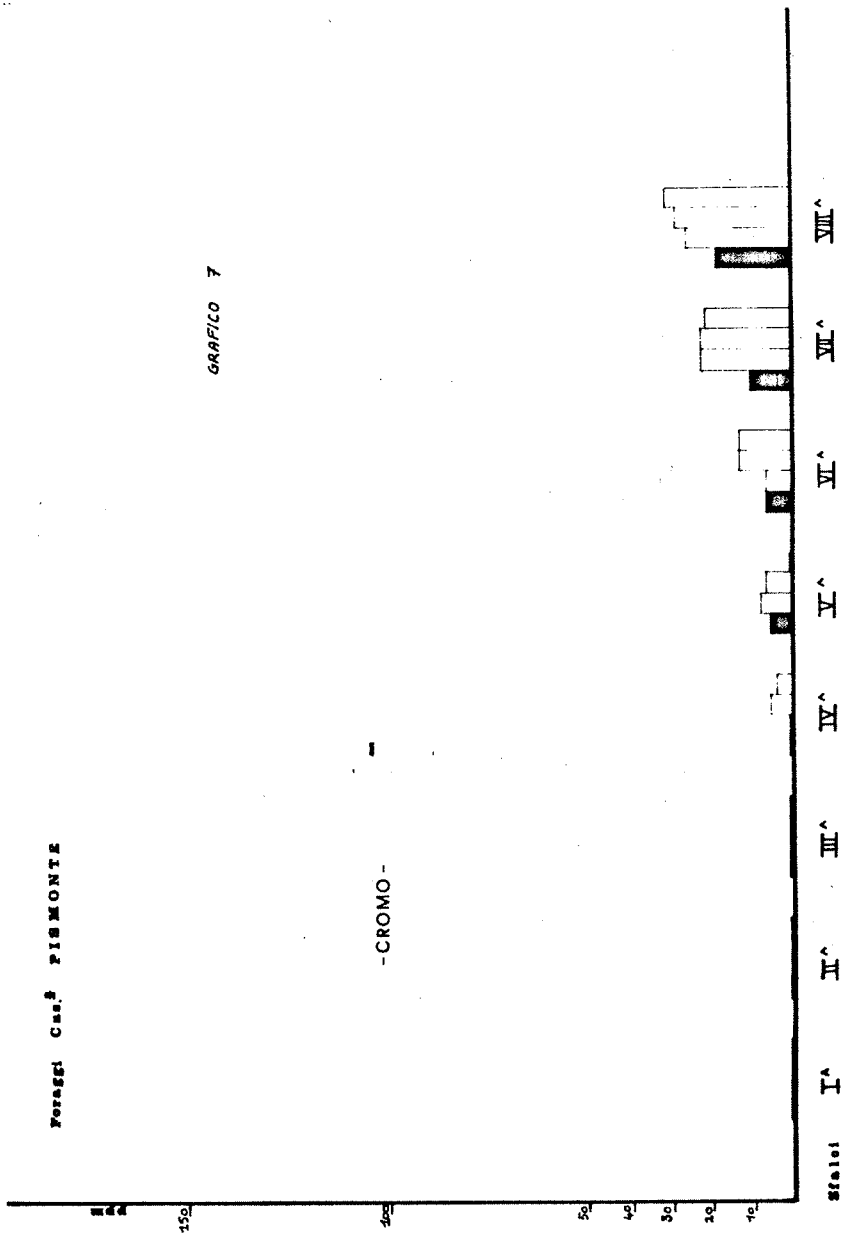
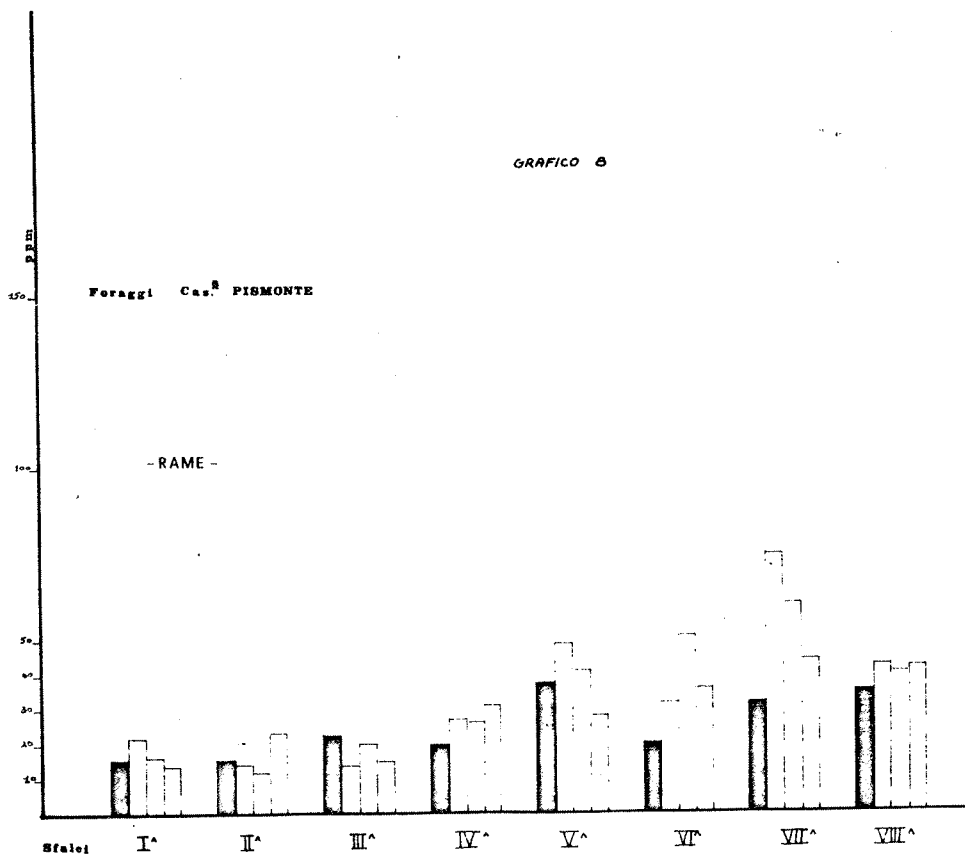
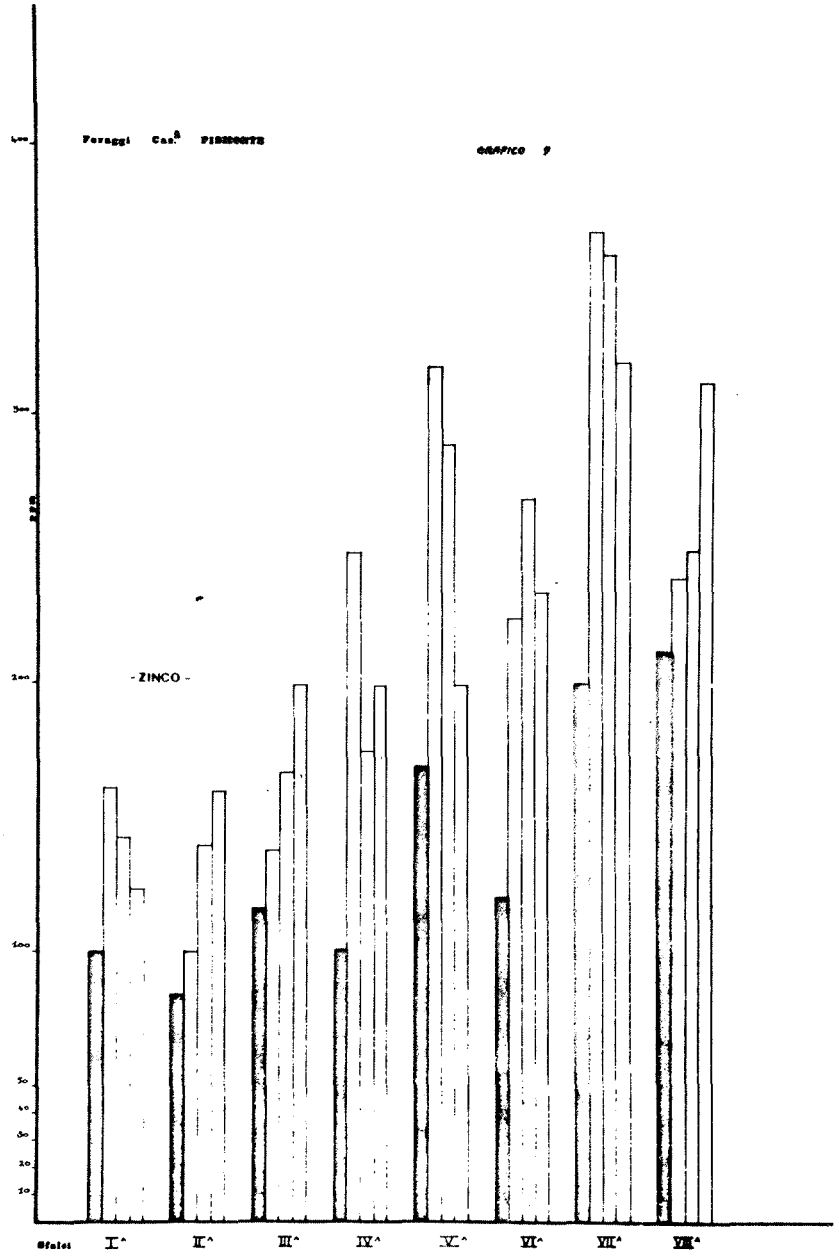




GRAFICO 8

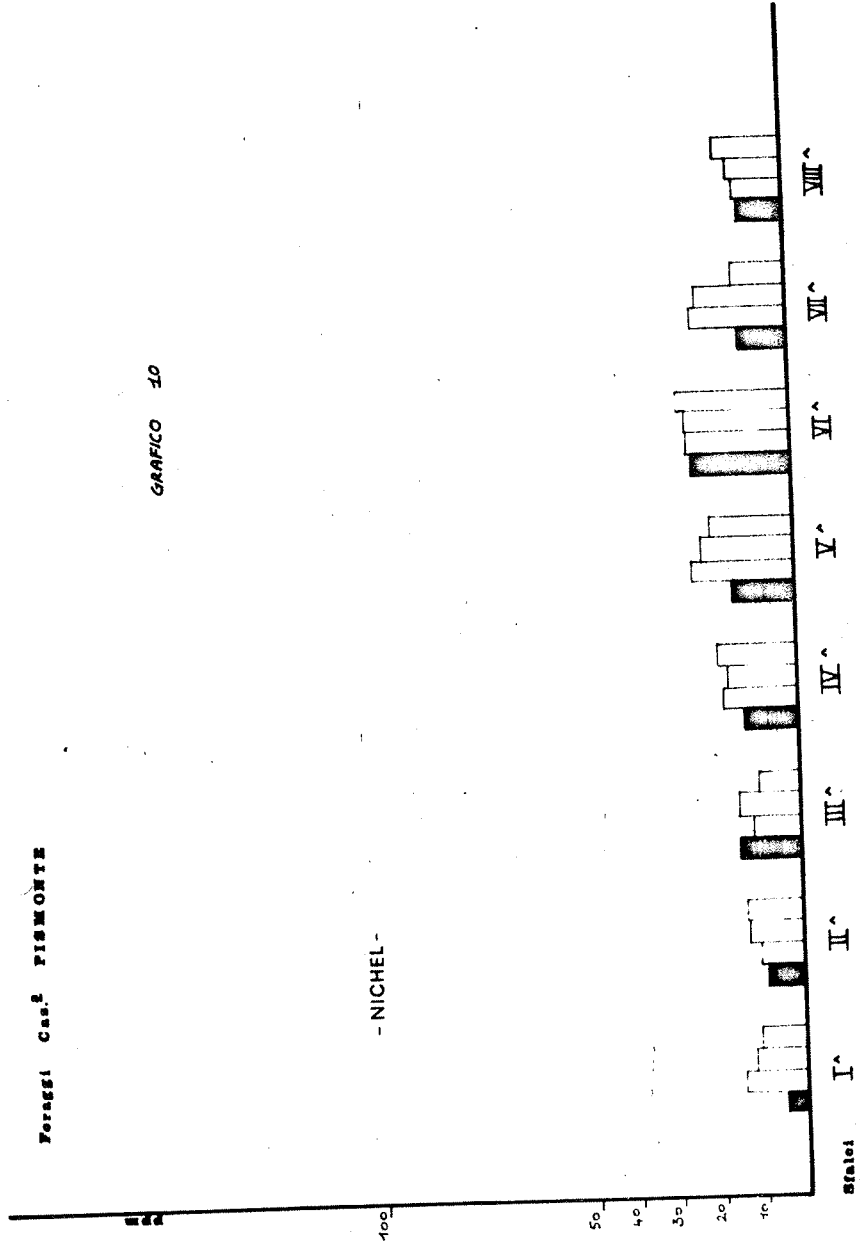


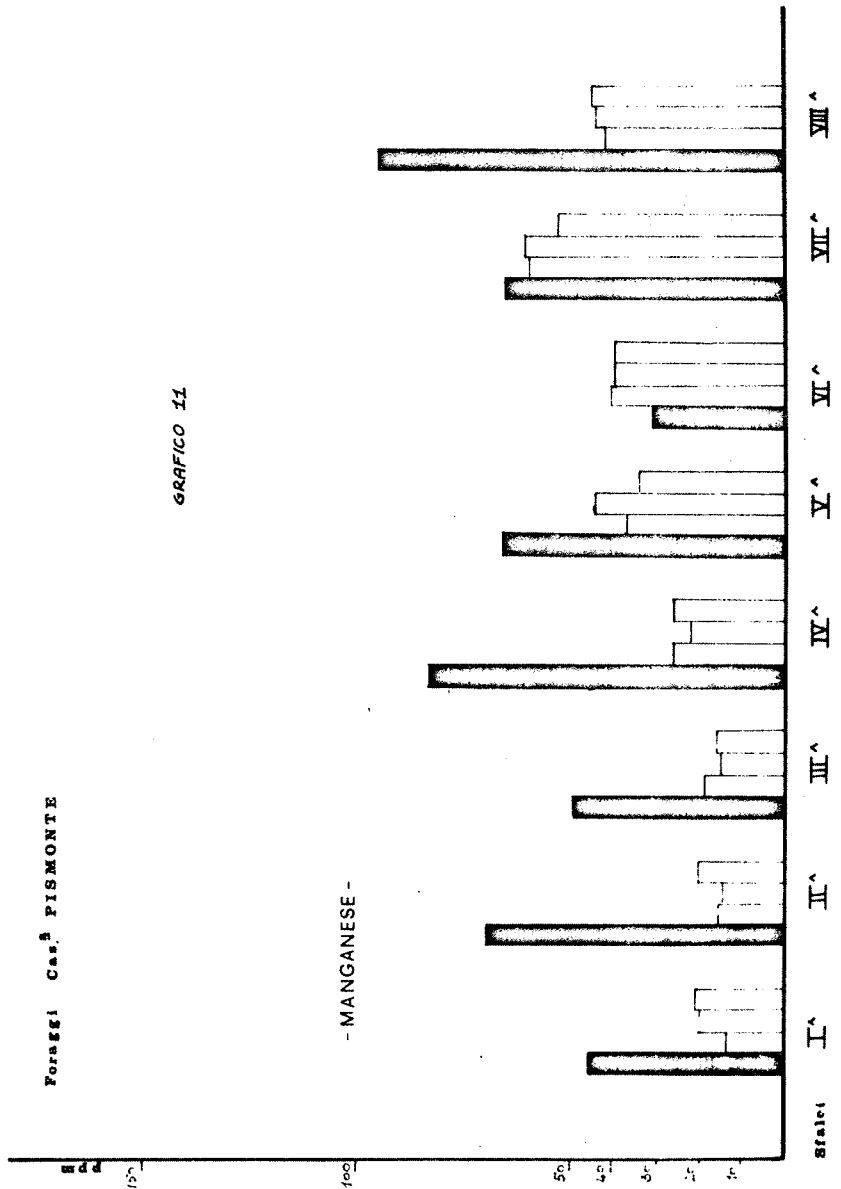


Foraggi Cas. PISMONTE

GRAFICO 10

- NICHEL -





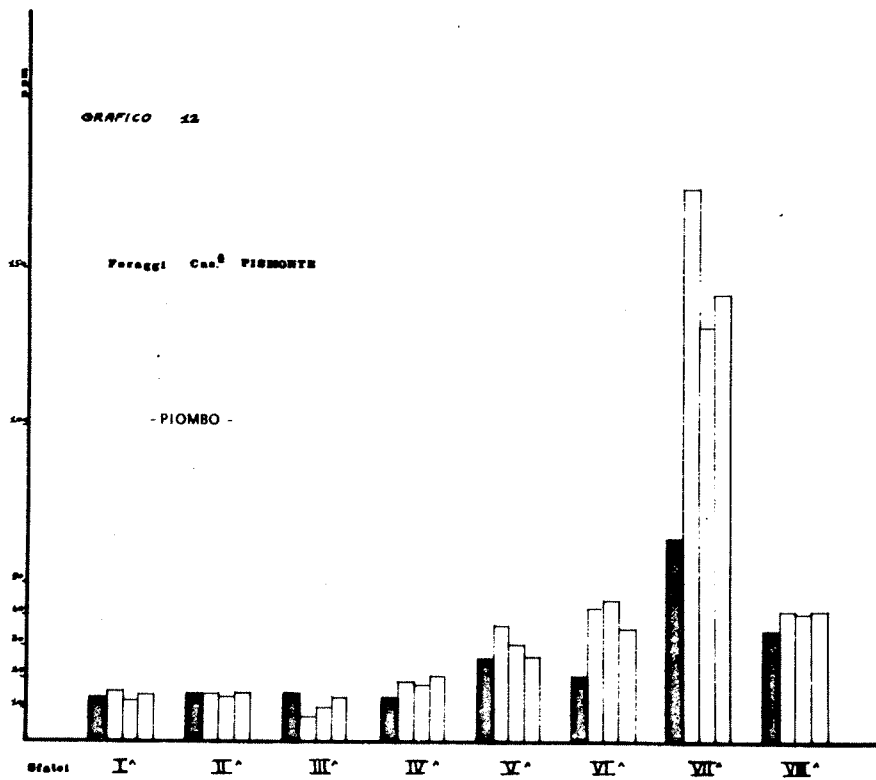
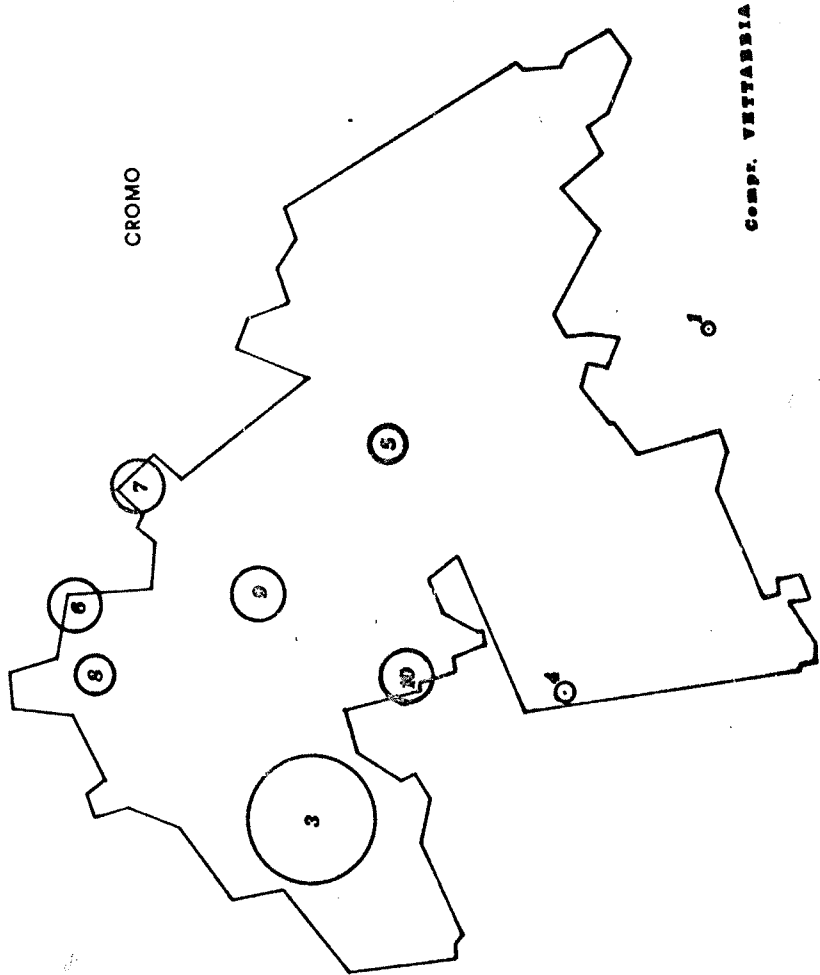
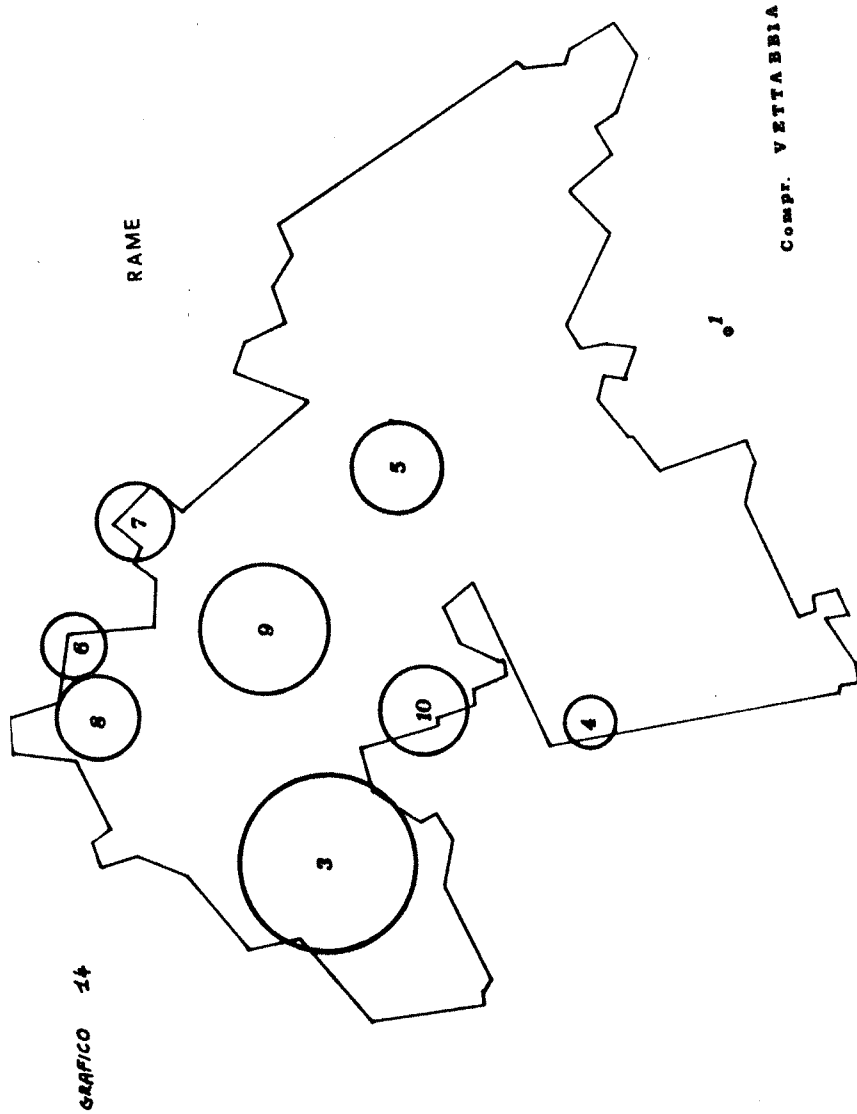
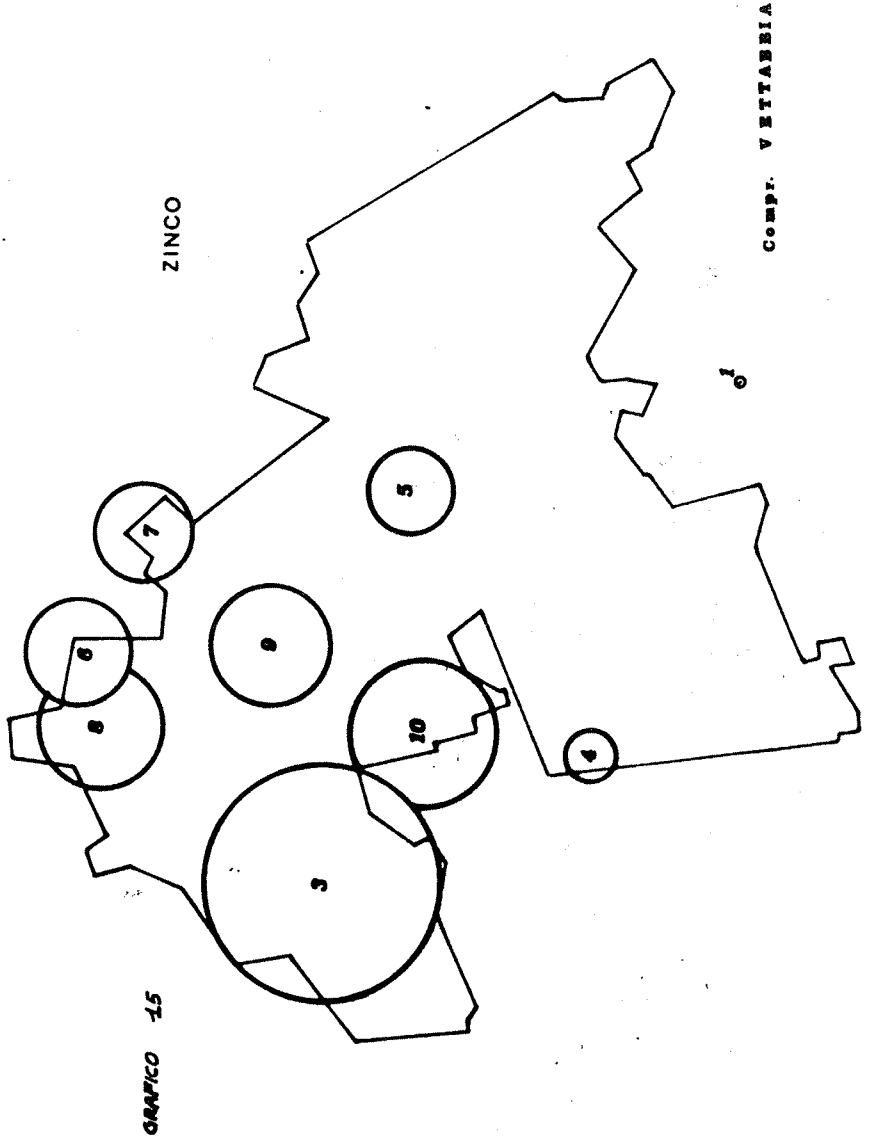


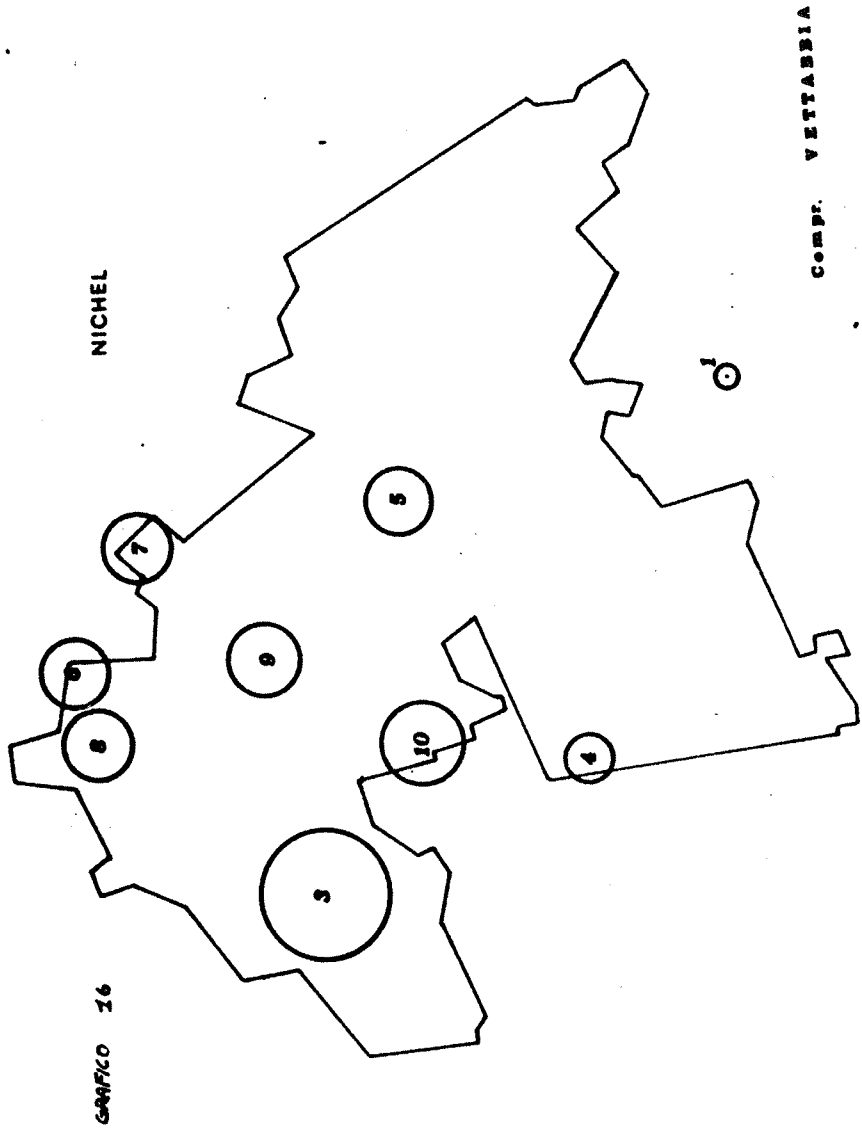
GRAFICO 13

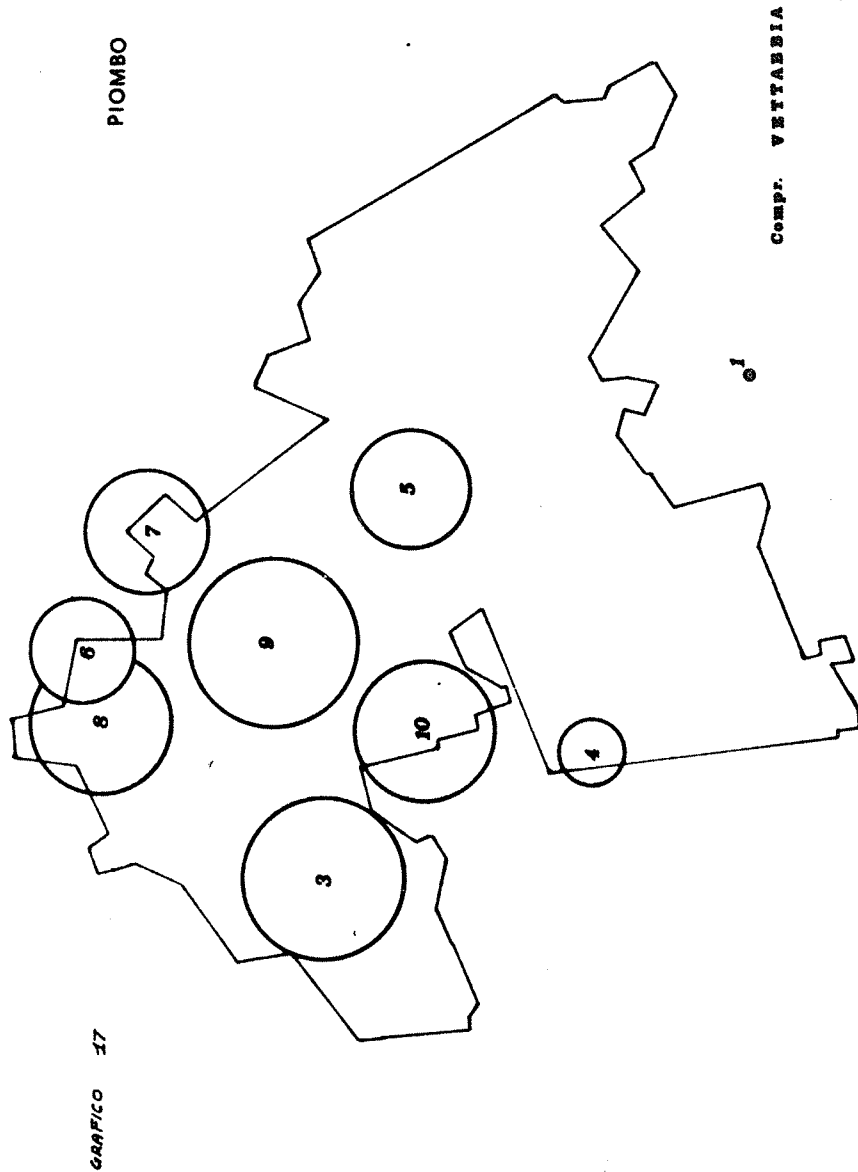












**GRAFICO 18**

TERRENI MARCITA CASONE (VA) - STRATO SUPERFICIALE  
CONTENUTO IN RAME - CROMO - NICHEL PPM

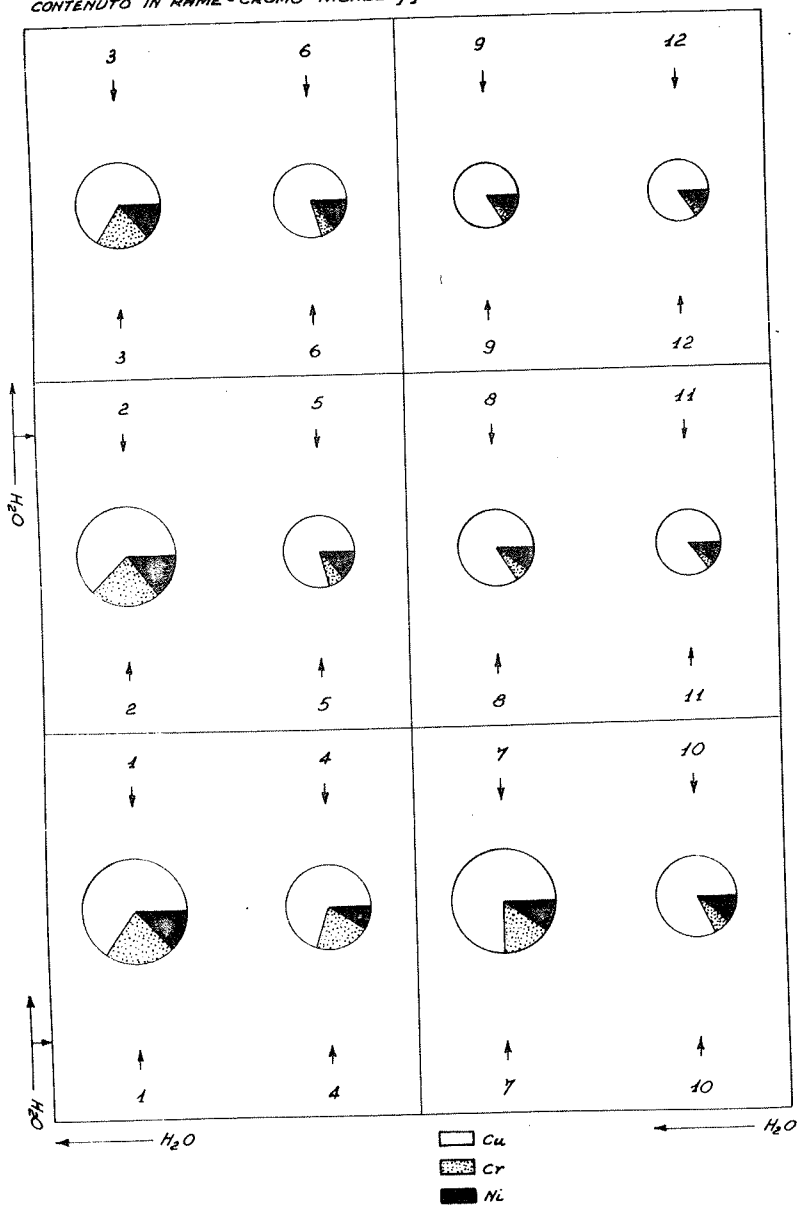


GRAFICO 19

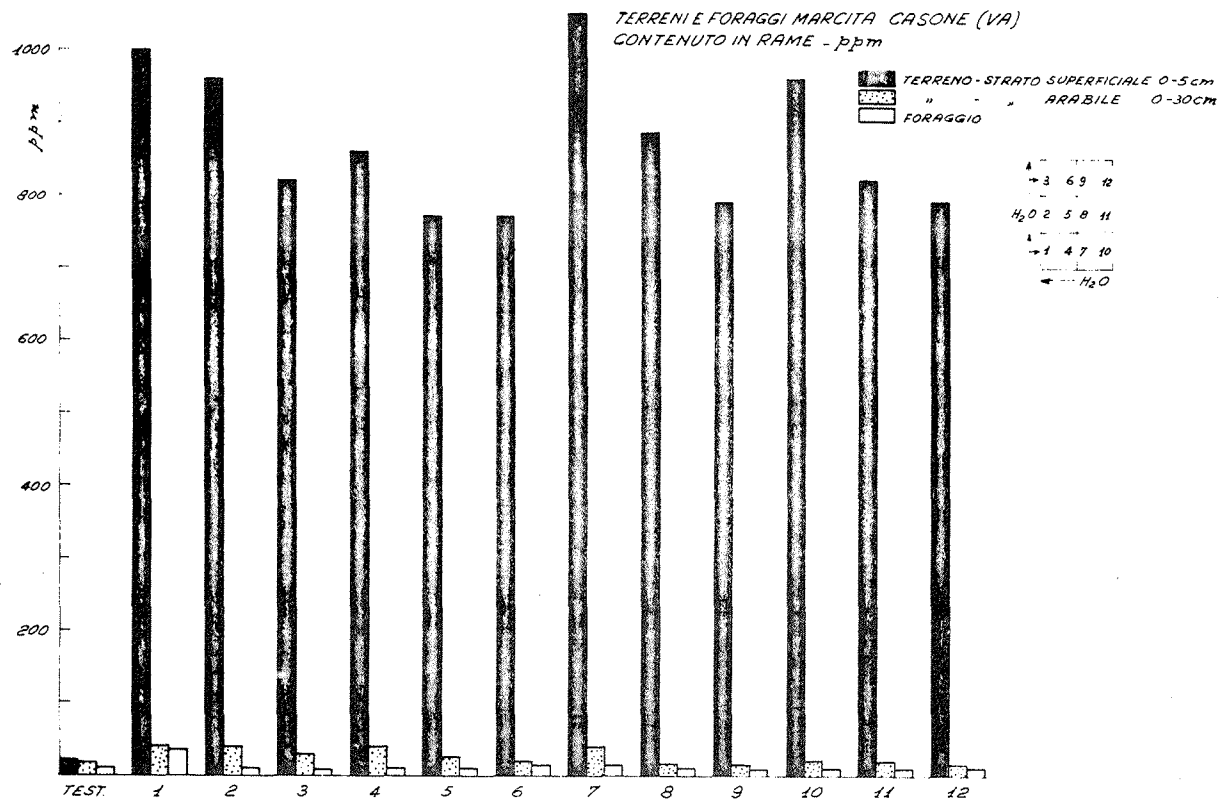



GRAFICO 20

TERRENI E FORAGGI MARCITA CASONE (VA)  
CONTENUTO IN CROMO PPM


  
 TERRENO STRATO SUPERFICIALE 0-5CM  
 " " ARABILE 0-30CM  
 FORAGGIO

400  
ppm

6	9	12
5	8	11
4	7	10
H <sub>2</sub> O		

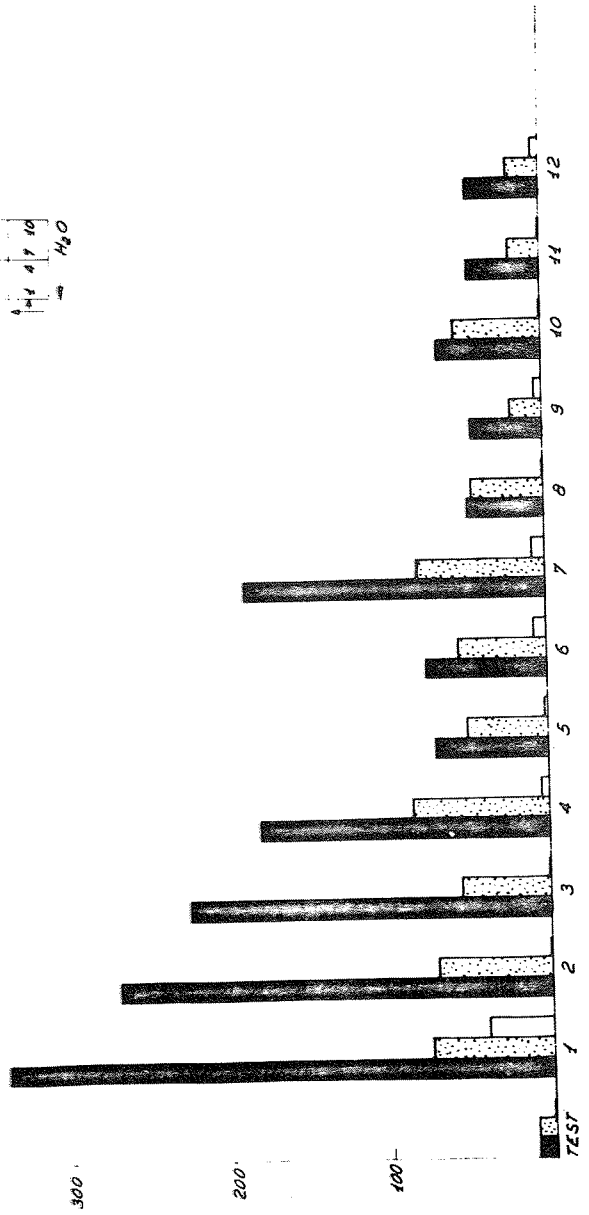




Tabella n° 1

Confronto tra i contenuti in Cromo, Rame e Nichel in terreni prelevati nel 1973 e nel 1974 (Cascina Casone - VA)							
N° campione e profilo cm	LUGLIO 1973			APRILE 1974			
	Cr ppm	Cu ppm	Ni ppm	Cr ppm	Cu ppm	Ni ppm	
1	0 - 5	226	820	150	340	160	98
	5 - 25	55	29	52	70	50	50
2	0 - 5	268	960	160	540	240	132
	5 - 25	75	42	60	152	110	66
3	0 - 5	65	960	100	520	200	101
	5 - 25	54	23	35	100	64	56
4	0 - 5	190	1050	125	464	111	111
	5 - 25	80	38	50	75	49	43

Tabella n° 2

Data del prelievo	Contenuto in metalli dello scarico (mg/l)			Portata dello scarico (l/s)	Apporti al Torrente Rancina (mg/s)			Portata del Torrente Rancina (l/s)
	Cr	Cu	Ni		Cr	Cu	Ni	
14.12.72	0.24	2.75	0.21	5.0	1.2	13.7	1.1	488
23.2.73	7.50	10.00	17.2	5.0	37.5	50.0	86.0	453
12.4.73	0.70	0.90	31.00	6.0	3.5	4.5	155.0	1497
29.5.73	1.60	2.15	20.00	5.0	8.0	10.7	100.0	576
1.8.73	0.97	0.86	10.00	5.0	4.8	4.3	50.0	629
11.10.73	0.41	23.6	37.60	4.8	2.1	118.0	188.0	161



Tabella n° 3

Contenuto in Cromo, Rame e Nichel nei terreni inquinati e non, prelevati presso la cascina Casone (VA).

Parcella 1 m <sup>2</sup>	Profondità dello strato cm	Cromo		Rame		Nichel	
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
4 - 8	0-5	* 1140	60	* 325	67	* 165	28
	5-10	378	60	110	59	96	26
	10-15	120	60	65	53	58	22
	15-20	94	60	70	46	50	22
	20-25	84	60	60	46	50	22
5 - 9	0-5	318	64	90	46	106	28
	5-10	80	64	50	43	52	28
	10-15	68	64	40	40	36	26
	15-20	68	64	50	34	36	26
	20-25	64	64	50	37	36	26
6 - 10	0-5	940	64	175	37	165	28
	5-10	114	64	80	37	70	28
	10-15	84	64	65	37	58	28
	15-20	72	66	55	34	52	22
	20-25	72	66	50	34	50	22
7 - 11	0-5	136	66	70	34	64	28
	5-10	74	60	50	30	42	28
	10-15	64	60	30	27	28	22
	15-20	64	60	30	30	28	22
	20-25	64	60	50	27	28	22

\*: terreno inquinato

Tabella n° 4

Contenuto in Cromo, Rame e Nichel, nei foraggi prelevati sui terreni di cui alla tabella n° 3.  
-Cascina casone (VA) -

Parcella 1 m <sup>2</sup>	Sostanza Secca gr/m <sup>2</sup>	C R O M O				R A M E				N I C H E L			
		ppm/s.s.		mgr/m <sup>2</sup>	% del Cr del terreno	ppm/s.s.		mgr/m <sup>2</sup>	% del Cu del terreno	ppm/s.s.		mgr/m <sup>2</sup>	% del Ni del terreno
4 - 8	227	12	<2	2,72	0.003	25	9	5.67	0.008	32	<4	7.26	0.034
5 - 9	286	26	<2	7.43	0.025	30	11	8.58	0.061	38	<4	10.87	0.082
6 - 10	240	33	<2	7.92	0.012	31	8	7.44	0.035	32	<4	7.68	0.039
7 - 11	263	7	<2	1.84	0.009	20	7	5.26	0.046	36	<4	9.47	0.099

(\*) : terreni inquinati.

Tabella n° 5

Confronto tra i contenuti in Cromo, Rame e Nichel in graminacee e infestanti (Cascina Casone VA)								
Bromus Arvensis Dactylis Glomerata Holcus Lanatus Poa Pratensis	Lunghezza delle radici cm		CROMO ppm/s. s.		RAMB ppm/s. s.		NICHEL ppm/s. s.	
	*		*		*		*	
	8	7	12	<2	25	9	32	<4
	"	"	26	<2	30	11	38	<4
	"	"	33	<2	31	8	32	<4
	"	"	7	<2	20	7	36	<4
Ranunculus spp	15	15	47	<2	37	12	24	<4
Rumex Obtusifolius	28	30	25	<2	25	12	13	<4
Taraxacum Officinale	18	18	105	<2	64	12	37	<4

(\*) terreni inquinati

# ASPETTI MICROBIOLOGICI DELL'INQUINAMENTO DELL'AMBIENTE DA MERCURIO E SUOI COMPOSTI

Giovanni Picci

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università di Pisa

## Generalità sugli inquinamenti

L'inquinamento del terreno si può considerare in primo luogo come una diretta conseguenza dell'inquinamento delle acque.

L'espansione urbanistica, spesso disordinata e mancante di una efficiente depurazione delle acque cloacali, nonché l'espansione industriale, possono portare all'inquinamento del reticolo idrico superficiale ed anche delle falde sotterranee. Evidentemente l'impiego di acqua contaminata per uso irriguo ha per conseguenza l'inquinamento del terreno. L'impiego dell'acqua per scopi irrigui è tutt'altro che trascurabile, registrandosi infatti un consumo di circa 66% della disponibilità complessiva, vale a dire circa 30 miliardi di mc annui su 45 assorbiti da tutte le utenze. Tale quantitativo è senz'altro destinato ad aumentare nel futuro, in seguito al potenziamento dei programmi d'irrigazione. La fonte di approvvigionamento dell'acqua di irrigazione è costituita approssimativamente dalle seguenti percentuali: 70% dai deflussi superficiali; 28% dai fontanili e pozzi e il rimanente 2% dai serbatoi.

Un'altra via per la quale il terreno può essere inquinato è quella dovuta ad un eccessivo o improprio uso di fertilizzanti chimici e pesticidi ("autoinquinamento"). Contrariamente a quanto possa sembrare, anche questa forma d'inquinamento può causare danni rilevanti, specialmente nei Paesi tecnologicamente avanzati, dove vengono impiegate quantità veramente notevoli di tali composti. Tanto per dare un'idea della portata dell'inquinamento

causato dalle acque, è stato accertato che il Fiume Reno in Olanda, mensilmente, porta 300 t di rame, 80 di arsenico, 20 di cadmio, 10 di mercurio e oltre 900 Kg di pesticidi.

Comunque, indipendentemente dalla sua origine, l'inquinamento del terreno è purtroppo una realtà e, tra i tanti problemi che esso pone, assai importante è quello dei rapporti che si vengono a stabilire tra l'inquinamento stesso e la microflora terricola.

Considerare, sia pure superficialmente, le influenze reciproche che si stabiliscono tra tutte le possibili fonti d'inquinamento e i microrganismi terricoli esorbiterebbe dai limiti della presente nota, data l'entità della mole dell'argomento in questione.

Infatti, le possibili interrelazioni tra microrganismi ambientali e materiale inquinante possono, a nostro avviso, essere classificate come segue: 1) azioni mineralizzanti o biodegradabili sul materiale inquinante medesimo; 2) azioni più o meno inibenti di quest'ultimo numero dei microrganismi del suolo e sulle loro attività biologiche; 3) azioni di trasformazione sul materiale inquinante con conseguente produzione di sostanze ugualmente tossiche o addirittura di tossicità maggiore.

Per quanto ci riguarda ci fermeremo a questo ultimo aspetto, limitandoci a considerare il mercurio e i suoi composti che rientrano, come vedremo, nell'ultimo tipo di interrelazioni sopra considerate.

#### L'inquinamento da mercurio e suoi composti

L'inquinamento da mercurio si può registrare nell'aria, nell'acqua e nel terreno e può essere causato fondamentalmente da industrie che producono o utilizzano mercurio e soprattutto dall'impiego dei mercuriali come sali inorganici e organici nell'agricoltura. L'inquinamento atmosferico da mercurio si deve alla vaporizzazione del mercurio stesso allo stato metallico, a differenza degli altri elementi pesanti. La pressione di vapore è bassa, per cui

anche a temperatura ambiente si possono raggiungere concentrazioni elevate, pari anche a 10-15 mg Hg/mc di aria.

Il primo impiego di composti di mercurio in agricoltura si registra in Germania nel 1914, come trattamento antifungino dei semi. Tale impiego costituisce anche oggi il principale campo di applicazione dei mercuriali, ma l'impiego di questi è esteso anche a trattamenti fogliari degli alberi da frutto, alle colture floricole di sera, alla lavorazione della carta ed altri numerosi settori. Si calcola che solo in Italia la quantità dei mercuriali adoperati per gli usi ora descritti si aggiri sulle 30 tonnellate annue ed in tutto il mondo tale quantitativo raggiunge le 2.000 t annue.

Il mercurio viene adoperato sotto forma di sali inorganici e derivati organici usati come fungicidi che hanno la formula R-Hg-X, dove R indica un radicale organico e X un gruppo di acido organico o inorganico. I composti che corrispondono alla formula R-Hg-R' (cioè con due radicali organici) non sono attivi come fungicidi o battericidi. Attualmente sono noti un centinaio di fungicidi con radicali organici diversi, sia della serie alifatica che di quella aromatica. I primi hanno un potere fungicida più elevato dei secondi e questi, a loro volta, sono più attivi come battericidi. Gli aril derivati vengono adoperati anche come erbicidi.

Riportiamo di seguito un elenco dei più noti mercuriali adoperati in agricoltura, facendo presente che le dosi impiegate possono variare da 0,01 a 2,5 g di Hg/Kg nel caso di trattamenti ai semi e da 11 a 6.000 g di Hg/ha nel caso di trattamenti al terreno o a piante.

Qualunque sia l'origine dell'inquinamento da mercurio, sta di fatto che le conseguenze si riscontrano nelle catene alimentari, sia acquatiche che terrestri.

La presenza di mercurio nei pesci, per quanto nota fin dal 1937 (Stock e Cucuel), ha suscitato l'interesse di molti ricercatori dal tempo della malattia della baia di Minamata (Kurland et al., 1960). Ricordiamo pertanto le

TABELLA 1 - Elenco dei principali mercuriali adoperati  
in agricoltura

---

Metilmercurio diciandamide ( PANOGEN)  
Metilmercurio solfato  
Metilmercurio cianuro (CHIPCOTE)  
Metilmercurio 8-idrossichinolato (METAZOL)  
N-(metilmercurio)-3,4,5,6,7,7-esacloro-3,6-endometilene-  
1,2,3,6-tetraidroftalimide (MEMMI)  
Metossietilmercurio cloruro (CERESAN-UNIVERSAL NASSBEIZE,  
ARETAN, AGALOL)  
Metossietilmercurio silicato (CERESAN-UNIVERSAL TROCKEN-  
BEIZE)  
Etilmercurio cloruro (GRANOSAN, ecc.)  
Etilmercurio fosfato  
N-(etilmercurio)-p-toluensulfoanilide (CERESAN-M)  
Fenilmercurio cloruro (CEREDON SPECIAL)  
Fenilmercurio bromuro (AGRONAL)  
Fenilmercurio urea (ARGOX, LEUTOSA)  
Fenilmercurio pirocatechina (GERMISAN)  
Fenilmercuriotrioetanolanmonio lattato (PURATIZED)  
N-(fenilmercurio)-3,4,5,6,7,7-esacloro-3,6-endometilene-  
1,2,3,6-tetraidroftalimide ( PIMM )  
N-(etilmercurio)-3,4,5,6,7,7-esacloro-3,6-endometilene-  
1,2,3,6-tetraidroftalimide (EMMI)

ricerche sistematiche intraprese in Svezia dal 1964 al 1969 (Westermarck, 1965; Johnels et al., 1967; Westoo, 1967, b, Johnels e Westermarck, 1969), in America del Nord (Fimreite, 1970; Jervis et al., 1970; Buhler et al., 1971, ecc.), in Finlandia (Aho, 1968; Hasanen e Sjöblom, 1968; Sjöblom e Hasanen, 1969), in Norvegia (Underdal, 1969), in Danimarca (Dalgaard-Mikkelsen, 1969), in Giappone (Ueda et al., 1971) ed in Italia (Ui e Kitamura, 1971).

Tutto il mercurio trovato nei pesci si trova sotto forma di metil derivato. Questo composto come è noto, ha una escrezione molto lenta e pertanto, un lungo periodo di contaminazione porta all'accumulo di alti livelli del tossico all'interno dell'animale.

Meno preoccupante, ma non per questo da sottovalutarsi, è la situazione delle catene alimentari terrestri. A parte infatti la presenza di alchil mercuriali in uccelli che mangiano pesci o semi trattati con fungicidi a base di mercurio (Borg, 1958; 1967; Borg et al., 1965, 1966, 1969; Hansen, 1965 a, b; Edeestan et al., 1969, ecc.), reperti positivi, sempre per il metil mercurio, sono stati trovati in altri animali, come maiali (fegato, muscolo, cervello) e renne (Westoo, 1967, a 1968, 1969, a, b, c, 1970).

#### Tossicità dei mercuriali

I composti del mercurio esercitano sui microrganismi, analogamente a tutti gli altri organismi viventi, azioni tossiche, l'entità delle quali è in rapporto alla quantità dei mercuriali, alla natura di essi, alla specie e più spesso al ceppo del microrganismo. A quest'ultimo riguardo c'è infatti da considerare il comportamento dei microrganismi verso tali composti, riscontrandosi infatti germi sensibili o resistenti, in modo del tutto analogo a quello osservato con altri elementi, antibiotici, ecc. Ciò costituisce un dato molto importante nei confronti del punto 3) precedentemente considerato. Vale a dire che i prodotti tossici derivati dalle trasformazioni microbiche dei mercuriali nel suolo e nelle acque saranno



tanto più cospicui quanto più i microrganismi interessati saranno Hg-resistenti.

Non è nostra intenzione entrare qui nei dettagli sull'azione tossica dei composti del mercurio sulla cellula microbica. Qui basterà ricordare che detta azione si manifesta principalmente a seguito del blocco dei gruppi sulfidrilici con conseguenze riscontrabili ad esempio all'alterazione della permeabilità cellulare e sugli enzimi sulfidril-dipendenti. Ugualmente bloccati risultano anche gli enzimi amino-dipendenti, ferro-dipendenti e rame-dipendenti. ( Inter alia: Wilkes e Palmer, 1932; Owens, 1953; Demis et al., 1954; Rothstein, 1954, 1955; Passow et al., 1959; Passow e Rothstein, 1960).

Recentemente Teruhiko e Atima (1969) hanno dimostrato l'attivazione della ribonucleasi in E.coli K12 a seguito di trattamenti con  $HgCl_2$ , ipotizzando la presenza di un inibitore specifico mercurio-sensibile nella cellula.

Il meccanismo di tossicità, al livello molecolare, negli organismi superiori da parte del mercurio è identico a quello sopra riportato. Nell'uomo il responso tossico è di due tipi: un fatto acuto, derivante principalmente da disfunzione renale, e uno cronico, manifestantesi talora dopo anni, derivante da contaminazioni, anche in tracce, dell'elemento del sistema nervoso centrale ( Rothstein, 1956). L'avvelenamento da mercurio può essere determinato anche da inalazioni di vapori del metallo, i quali penetrano nei polmoni dove si depositano e da dove viene assorbito dall'organismo. All'assorbimento consegue l'ossidazione a mezzo di ossigeno e appaiono quindi nel sangue gli ioni mercurici (Clarkson et al., 1961).

In aggiunta a fenomeni tossici manifestati dal mercurio, c'è da tener presente anche l'azione che i mercuriali esplicano a livello del nucleo delle cellule.

Tale proprietà è nota fino dal 1937, quando Sass dimostrò disturbi nella mitosi e poliploidia in cellule vegetali a seguito di trattamento con fosfato di etilmercurio. Senza entrare troppo in particolari, accenneremo all'in-

fluenza dei mercuriali sulla divisione cellulare, alle rotture cromosomiche e alle mutazioni.

Per quanto concerne la citodieresi, particolarmente preoccupante è la mitosi-c, la quale consiste-come è noto in un' inattivazione (parziale, nel caso del mercurio) del fuso mitotico. Esperienze al riguardo sono state condotte su apici radicali di Allium cepa (Levan, 1945; Fahmy, 1951; Ramel, 1967, 1969; Fiskejo, 1969) e su cellule animali (Umeda et al., 1969; Fiskejo, 1970; Okada e Oharazawa, 1967). L'alterazione del fuso mitotico può portare ad errori nella distribuzione di un singolo cromosoma con possibile incremento di disordini congeniti come mongolismo, il quale dipende appunto da erronea distribuzione di un singolo cromosoma.

Anche la meiosi sembra essere alterata in modo analogo alla mitosi (meiosi-c) da metil mercurio (Ramel e Engstrom, dati non pubblicati). Ne consegue un aumento nella frequenza nell'errata distribuzione dei cromosomi sessuali (non disgiunzione), come dimostrano i numerosi reperti ottenuti con Drosophila melanogaster (Ramel e Magnusson, 1969, 1971; Ramel, 1970 ecc.).

Le rotture cromosomiche da metil mercurio sembrano essere causate da un'azione diretta del mercuriale piuttosto che da una indiretta, vale a dire dal blocco di enzimi o meccanismi analoghi. Ciò sarebbe in accordo con ricerche condotte in vitro su DNA, essendosi infatti osservato che il metil mercurio si lega al DNA stesso, provocandone la denaturazione (Gruenwedel e Davison, 1966).

Infine si può dire che l'effetto mutageno del metil mercurio sia di modesta entità. Questo non tanto perchè il composto non abbia potenzialmente tale proprietà, quanto perchè la maggior parte delle molecole di metil mercurio appena entrano nella cellula vengono immobilizzate da gruppi reattivi (principalmente -SH) prima di raggiungere il nucleo e i cromosomi.

Le ricerche riguardanti l'azione tossica del mercurio sulle piante sono, a quanto ci risulta, assai meno nume-

rose di quelle sull'uomo.

Per quanto concerne le vie di assorbimento dei mercuriali da parte dei vegetali si può affermare che l'apparato radicale svolge al riguardo un ruolo di secondaria importanza, poichè le esigue quantità di tali composti che eventualmente penetrano per tale via hanno una scarsa mobilità verso le altre parti della pianta.

Al contrario, il mercurio può essere trasferito dai semi trattati con mercuriali ai tessuti della plantula, come è stato accertato usando  $^{203}\text{Hg}$  (Robson e Fenn, 1961).

La via principale di penetrazione del mercurio nella pianta è però quella fogliare, come è stato dimostrato in piante di riso (Tomizawa, 1956; Araki et al., 1965) e in alberi da frutto (Ross e Stewart, 1962). Per quanto concerne i residui di mercurio nella pianta, disponiamo di una serie di dati sui quali non crediamo opportuno dilungarci. Basterà soltanto accennare che tutti i vegetali contengono tracce di mercurio dell'ordine di nanogrammi. Ovviamente tali quantità aumenteranno in funzione di eventuali trattamenti con mercuriali o a seguito di esposizione delle piante a vapori di mercurio. Esemplichiamo brevemente. Nel riso i valori trovati sono: piante non trattate: 0,05 p.p.m., trattate: 0,2 p.p.m. (Fukunaga e Tsukano, 1969). Mele e pere, fruttiferi non trattati: 0,01-0,02 p.p.m., trattati: 0,1-0,2 p.p.m. (Smart, 1968). Pomodoro, nel caso di applicazione di fungicidi in serra sono stati trovati residui pari a 0,05 p.p.m. Patata: trattate: 0,03 p.p.m.; non trattate: 0,03 p.p.m. (Smart, 1964; Ross e Stewart, 1964).

Una volta penetrati nella piante i composti mercurio-organici non si trovano più nelle foglie allo stato libero, ma si associano alle proteine perdendo così la loro attività fungicida e la loro azione inibitrice sulla crescita della pianta (Moriya et al., 1965). Dati assai interessanti sono riportati da Galoppini (1974) riguardanti la sorte del mercurio metallico che sotto forma di vapori è assorbito dalle foglie. Il tabacco coltivato in

serra assorbe dosi crescenti di mercurio fino a raggiungere la concentrazione di 5.675 p.p.m. sul materiale secco dopo 70 giorni di permanenza nell'ambiente contaminato da vapori di mercurio. Non solo, ma si registra un aumento anormale di alcuni aminoacidi parallelamente al mercurio assorbito, quali ad esempio la cistina, l'acido glutamico e la glicina. Particolarmente significativo l'aumento di cistina, facendo pensare all'azione di fissazione del mercurio da parte dell'aminoacido per bloccare l'azione tossica dell'elemento (Anelli et al., 1973; Pelosi et al., 1973).

#### Azioni microbiche sui mercuriali

Le azioni microbiche sui composti di mercurio sono riportabili fondamentalmente a quattro: azione di ossidazione, di riduzione, di organicazione e di mineralizzazione.

Le azioni ossidative si hanno a carico del solfuro di mercurio (cinabro) il quale viene trasformato prima in solfito e poi in solfato (Jensen e Jernelov, 1972). L'azione  $Hg^{+2}$ , una volta reso solubile, oppure se già di per se tale, va incontro ad azioni riduttive ad opera di un enzima presente in certi microrganismi, come ad esempio Pseudomonas sp. ed E.coli (Komura et al., 1970). Tale enzima richiede NADH come coenzima (Komura et al., 1970; Summers, 1974) e la riduzione avverrebbe nel modo seguente



Il mercurio metallico che viene prodotto, mentre in ambiente anaerobico rimane inalterato (Tonomura e Kanazaki, 1969; Furukawa et al., 1969), in aerobiosi vaporizza e pertanto la reazione sopra citata può essere considerata un meccanismo di disintossicazione messo in atto dalla cellula microbica.

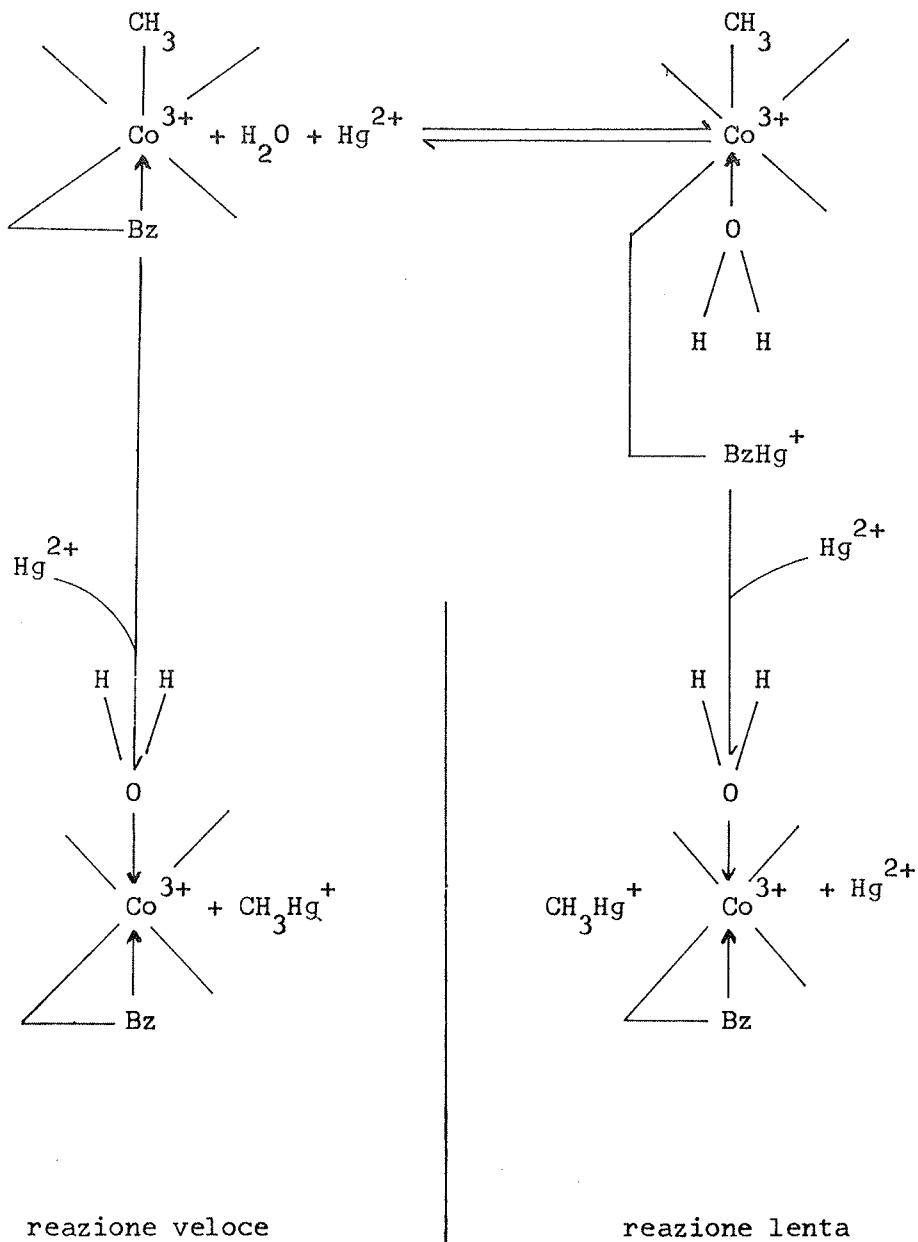
Le azioni di organicazione si esplicano a carico di

$\text{Hg}^{+2}$  il quale può essere trasformato, sempre per opera microbica, in metil mercurio e dimetilmercurio (alchilazione del mercurio). Queste azioni si svolgono nei sedimenti dei fiumi o dei laghi e i prodotti alchilati che si formano, altamente tossici, possono pervenire all'uomo attraverso le catene alimentari (Jensen e Jerne, 1969). Casi di avvelenamenti collettivi per questa ragione sono stati registrati ad esempio in Giappone nella zona della baia di Minamata, tanto che attualmente tale sindrome viene denominata "Minamata Bay disease". Casi di avvelenamento analogo si sono pure avuti in Svezia (Borg, 1958).

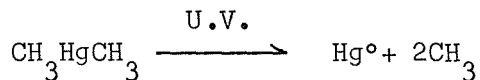
I coenzimi che partecipano alle reazioni di trasmetilazione nei sistemi biologici sono tre: adenosilmetionina, derivati di  $\text{N}^5$ -metiltetraidrofolato e derivati dei metilcorrinoi. I primi due non sono capaci di trasferire gruppi metilici al mercurio perchè questi vengono trasferiti come  $\text{CH}_3^+$ . I metilcorrinoi sono invece capaci di trasportare il metile come  $\text{CH}_3^-$  (Wood et al., 1968; Hill et al., 1970; Bertilsson e Neujahr, 1971; Schrauzer et al., 1971). Questa via metabolica della metilazione del mercurio fu dimostrata da Wood et al. (1968) i quali lavorarono con estratti cellulari di un batterio metanogeno isolato da Bryant et al. (1967) da una coltura mista proveniente da fango di un canale a Delft (Olanda). Ricerche recenti hanno messo in luce i dettagli del meccanismo della biosintesi del metil mercurio e del dimetilmercurio (Wood e Brown, 1972; Wood et al., 1972; De Simone et al., 1973).

Secondo tali ricerche, la metilazione del mercurio sarebbe conforme ai seguenti schemi.

Bz rappresenta 5,6-dimetilbenzimidazolo in un derivato metil- $\text{B}_{12}$ . Il pH ottimale è 4,5. La reazione lenta procede circa 1.000 volte più adagio di quella veloce. Il dimetil mercurio è biosintetizzato con un meccanismo identico, salvo che la molecola reagente è  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  anzichè  $\text{Hg}_2^+$ . La sintesi del composto bialchilato è però 6.000 volte



te più lenta rispetto a quella del composto monoalchilato. Il dimetil mercurio è volatile e, una volta giunto nell'atmosfera, è fotolizzato dalla luce ultravioletta nel modo seguente:



I radicali metilici possono combinarsi con idrogeno oppure accoppiarsi, per dare rispettivamente metano ( $\text{CH}_4$ ) o etano ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ).

L'alchilazione del mercurio è stata dimostrata essere sostenuta anche da Neurospora crassa (Landner, 1971) la quale non adopera la vitamina  $\text{B}_{12}$  nel suo metabolismo (Dalal et al., 1961; Selhub et al., 1969). Secondo Landner (1971) il gruppo metilico -sia sintetizzato de novo oppure no (Selhub, 1969)- viene trasferito all'atomo di mercurio che è complessato all'omocisteina. Il ricordato Autore non precisa tuttavia il meccanismo enzimatico per mezzo del quale avviene la trasmetilazione, sebbene faccia menzione alla via biosintetica della metionina. Pertanto l'alchilazione del mercurio può essere considerata come una sintesi "errata" di metionina e tale sintesi continua fino a che è disponibile omocisteina. Questo fatto è possibile probabilmente perchè il complesso metil mercurio-omocisteina non esercita un controllo feed-back sull'enzima metilante. La metionina, invece, manifesta azione inattivante su tale enzima o reprime la sua sintesi. Pertanto un'eventuale inibizione della produzione di uno degli enzimi della via biosintetica della metionina, dà luogo ad una continua metilazione di mercurio.

Anche se l'alchilazione del mercurio può essere talora non enzimatica ( Bertlsson e Neujahr, 1971 ; Irukayama et al., 1967), rimane anche la natura biologica del processo, legata come si è detto allo stato anaerobico dell'ambiente e al numero dei batteri capaci di sintetizzare alchilcobalamina ( Lezius e Barker , 1965; Wood e Wolfe, 1966).

E' possibile che altri metalli pesanti subiscano trasformazioni analoghe a quelle del mercurio. Ad esempio, ciò può verificarsi per lo stagno, il palladio, il platino, l'oro e il tallio, mentre il piombo, il cadmio e lo zinco non sono metilati. Questo succede perchè i composti alchilici dei tre ultimi elementi non sono stabili in sistemi acquosi e inoltre non si ha trasferimento di gruppi metilici da composti metil-B<sub>12</sub> (Agnes et al., 1971).

A margine ricorderemo che, tra i metalloidi, l'arsenico, sotto forma di arseniato, può anch'esso subire azioni di metilazione ad opera microbica, previa riduzione ad arsenito, con produzione di dimetilarsina e trimetilarsina che sono estremamente tossiche (Challenger, 1945; McBride e Wolfe, 1971). Queste arsine sono successivamente ossidate ad acido cacodilico il quale però, a sua volta, è un precursore nella sintesi della dimetilarsina.

Composti alchil-arsenicali sono stati trovati in molluschi in Norvegia (Jernelöv, 1974).

Le azioni di mineralizzazione sui mercuriali organici consistono nella scissione del legame Hg-C, con conseguente formazione di Hg<sup>0</sup>, il quale, come già detto, vaporizza. La mineralizzazione dei composti mercurio-organici può avvenire oltre che per via biologica, anche per via chimica. Tale degradazione avviene più facilmente con gli aril e gli alcossialchil derivati, rispetto ai corrispondenti composti alchilici (Makarova e Nesmeyanov, 1967).

Pertanto le ricerche sulla mineralizzazione di tali composti sono in prevalenza condotte insieme a quelle sulla vaporizzazione del mercurio metallico.

I primi lavori in proposito si debbono a: Tonomura et al. (1968a) i quali osservarono in un primo momento l'assorbimento di cloruro mercurico (MC) e di acetato di fenil mercurio (PMA) sulla superficie delle cellule di un batterio del genere Pseudomonas, ceppo K62. Successivamente gli stessi Autori (1968b) precisarono la natura debole dei legami stabilentisi tra mercurio e cel



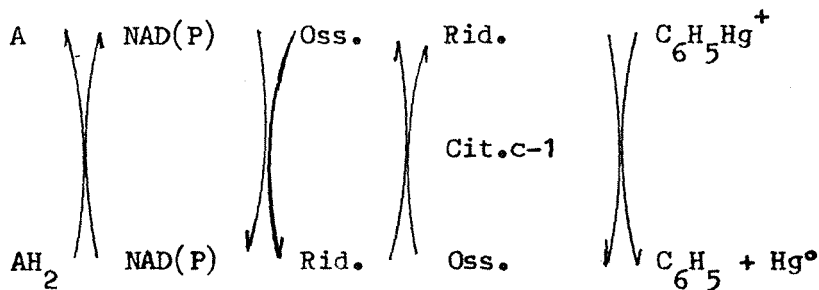
lula e dimostrarono la scomparsa sia del PMA che dell'MC; mediante l'impiego di composti marcati, dalle cellule e quindi del mezzo colturale.

Furukava et al. (1969) coltivarono in mezzo aereato lo stesso microrganismo in presenza di vari composti mercurio-organici, separatamente adoperati e marcati, e precisamente acetato di fenilmercurio (PMA), fosfato di etil mercurio (EMP) e cloruro di metil mercurio (MMC).

I ricordati Autori confermarono la scissione del legame C-H osservando la produzione di etano da EMP, di metano da MMC e di benzene da PMA. Il prodotto vaporizzato era costituito da mercurio metallico.

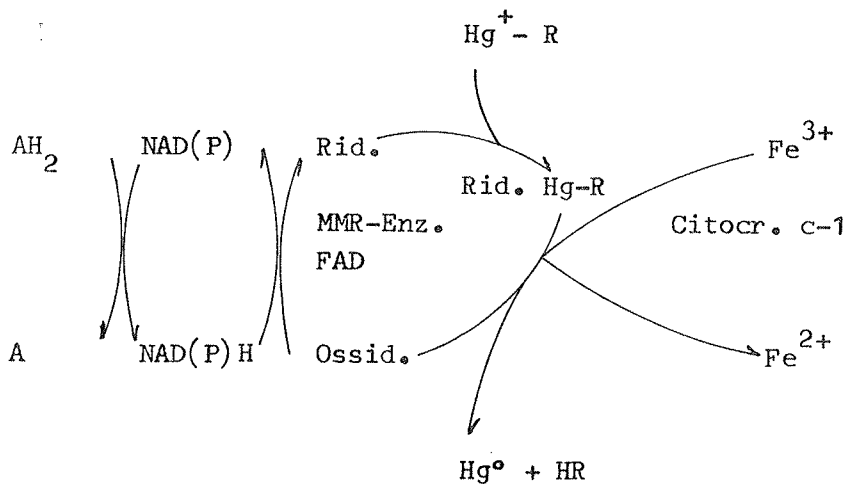
Tomura e Kanazaki (1969) dimostrarono che la mineralizzazione degli stessi composti mercurio-organici sopra citati avveniva anche con estratti cellulari dello stesso ceppo di Pseudomonas. Ricerche ulteriori che confermano la vaporizzazione del mercurio, derivato sia da composti organici che inorganici, si debbono a Komura et al. (1970, 1971a,b; Summers e Silver, 1972; Summers e Lewis, 1973).

La scissione del legame C-Hg nei mercuriali organici è di natura riduttiva. Furukava e Tonomura (1971), studiando la decomposizione enzimatica di acetato di fenil mercurio (PMA) ad opera di un ceppo di Pseudomonas Hg-resistente, ipotizzarono una catena di trasportatori di elettroni dal substrato al composto di mercurio organico.



Il secondo termine della catena fu pensato essere un enzima flavinico, la cui natura, a quell'epoca, rimase incerta. Successivamente gli stessi AA. (1973) confermarono trattarsi in realtà di una flavoproteina contenente FAD come gruppo prostetico e fu denominata MMR-enzima ("metallic mercury-releasing enzyme"). I composti saggiati erano acetato di fenil mercurio (PMA), cloruro di metil mercurio (MMC), fosfato di etil mercurio (EMP) e cloruro di mercurio (MC). Il microrganismo adoperato era ancora Pseudomonas sp. ceppo K62. In tutti i casi si aveva liberazione di  $Hg^0$  e dei rispettivi radicali. L'enzima MMR dimostrava una certa specificità di azione, in quanto la decomposizione degli alchil mercuriali era più difficoltosa di quella del fenil mercurio. Anche il cloruro di mercurio veniva ridotto dallo stesso enzima.

Un nuovo schema sulla decomposizione riduttiva degli organo-mercuriali veniva proposto.



Conferma della mineralizzazione riduttiva di metil mercurio con produzione di metano ad opera di quattro ceppi di Pseudomonas è fornita da Spangler et al. (1973).

In effetti, anche la mineralizzazione dei mercuriali

organici con produzione di  $Hg^0$  si può considerare un'azione di disintossicazione, in modo del tutto analogo a quanto abbiamo detto circa la riduzione di  $Hg^{2+}$  con produzione di  $Hg^0$ .

### La mercurio-resistenza dei microrganismi

In senso generale potremmo distinguere 4 possibili meccanismi di resistenza da parte della cellula microbica a veleni ambientali:

- 1)- Disintossicazione a mezzo di enzimi esocellulari.  
Esempio: l'azione della penicillinasi prodotta da Staphylococcus aureus.
- 2)- Inibizione del trasferimento della sostanza tossica all'interno della cellula a mezzo di cambiamento conformazionale della membrana citoplasmatica, con conseguente impermeabilizzazione per il tossico.  
Esempio: il meccanismo della resistenza al cadmio da parte di S. aureus, ceppo  $Pc^r$  (Kondo et al., 1974).
- 3)- Distruzione del composto tossico introdotto nella cellula a mezzo di meccanismi intracellulari portanti a trasformazioni del tossico stesso in forme innocue.  
Esempio: azione di S. aureus, ceppo  $Pc^r$  sugli ioni di Hg (Kondo et al., 1974).
- 4)- Rimozione del tossico dalla cellula.  
Esempio: la trasformazione dei mercuriali in  $Hg^0$  e conseguente vaporizzazione.

La resistenza ai composti di mercurio riscontrata nei microrganismi è conferita da geni extracromosomiali, cioè da plasmidi. Tali replicons ospitano inoltre geni responsabili della resistenza ad antibiotici ed in certi casi anche al cobalto, nichel, cadmio e arsenico. E' possibile infine il trasferimento intercellulare di questi plasmidi per mezzo di coniugazione e di transduzione (Novick, 1967; Smith, 1967).

La Hg-resistenza da plasmidi è stata descritta in molti ceppi di enterobatteri, di Pseudomonas aeruginosa

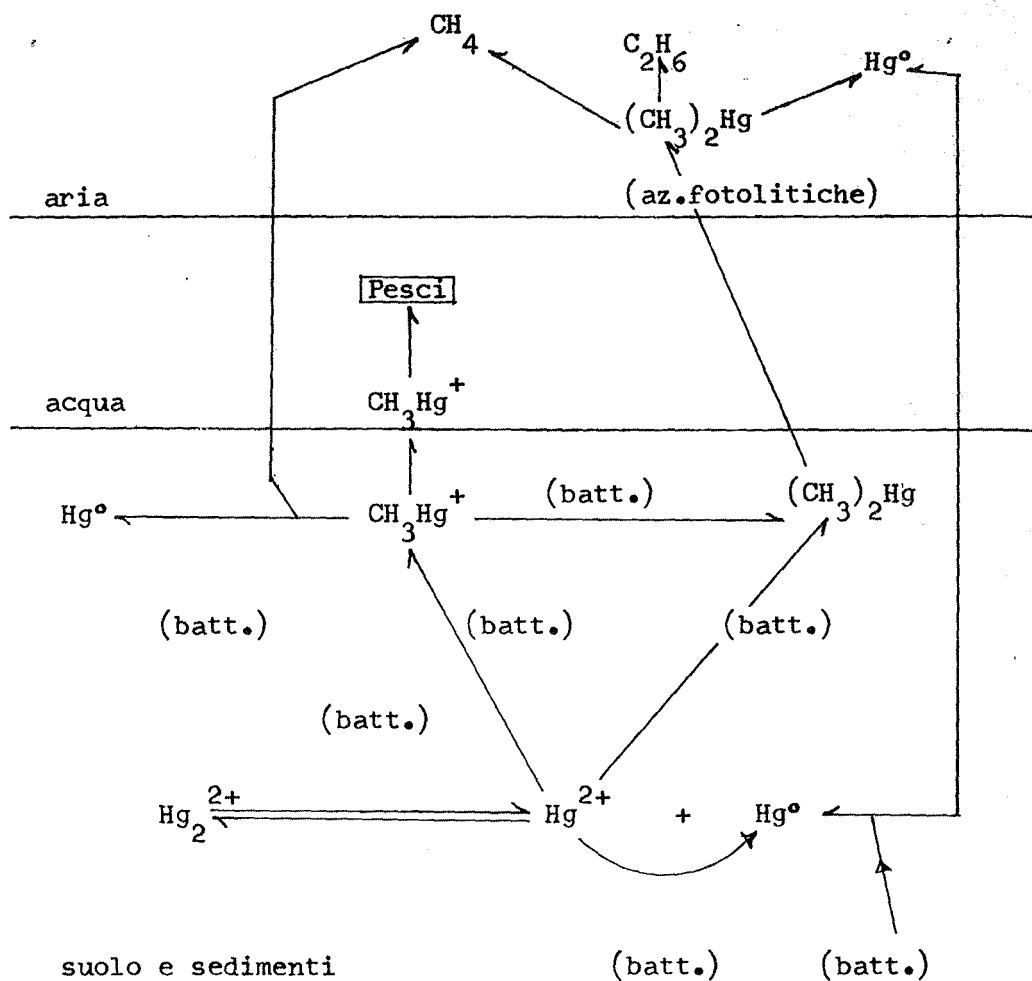
e di stafilococchi (Richmond e John, 1964; Smith, 1967; Novick, 1967; Loutit, 1970; Komura et al., 1970, 1971a,b; Summers e Silver, 1972; Kondo, 1974). Tale resistenza si spiega nel fatto che i microrganismi sono capaci di trasformare i composti di mercurio, organici o inorganici, in  $Hg^0$  ( o in qualche altro composto volatile) con conseguente vaporizzazione nell'ambiente, venendo pertanto allontanato dalla cellula. Fa però eccezione un ceppo di S.aureus studiato da Kondo (1974) che trasformerebbe  $Hg^{2+}$  in un altro tipo di ione, peraltro non ancora identificato, meno tossico per la cellula. Questo particolare tipo di resistenza ricade pertanto nel gruppo 3 d'anzi considerato.

Infine, accenneremo al fatto che alcuni microrganismi, pur non potendosi chiamare mercurio-resistenti, dimostrano una minore sensibilità ai mercuriali quando essi microrganismi si trovino associati con altri. Questo fatto non è limitato al mercurio, ma si può estendere ad altri casi. Ad esempio Desulfovibrio desulfuricans è resistente ai fenoli in presenza di Pseudomonas aeruginosa (Bennett e Banerle, 1960), S.aureus è protetto da E.coli verso numerosi antibiotici e fenoli (Stutzenberger e Bennett, 1963). Ad esempio l' $Hg$ -tolleranza è spiegata in primo luogo dalla produzione extracellulare da parte dell'enterobatterio E.coli di glutatione e  $H_2S$ . Come è noto, molecole contenenti gruppi sulfidrilici inattivano i composti di mercurio che reagiscono con esse (McCalla, 1940; Cavallito et al., 1945; Cook e Steel, 1959 ecc.).

Al termine di questa breve rassegna sintetica, potremmo schematizzare in accordo con Wood (1974), un ciclo biologico del mercurio, tenendo presente gli ambienti (rispettivamente suolo, acqua e aria) dove tale ciclo si svolge.

Da quanto succintamente esposto, potremmo concludere che i microrganismi svolgono un ruolo significativo riguardo alla mobilità del mercurio e suoi composti.

Particolarmente importanti sono le azioni di alchila-



zione, sia per la natura estremamente tossica dei metil mercuriali, che per i fenomeni di accumulo che si riscontrano, data la stabilità di essi. Non solo, ma la quantità di metil mercurio di origine biologica può aumentare in rapporto alla Hg-resistenza dei microrganismi, potendo questi ultimi produrre quantitativi di  $CH_3Hg^+$  anche 10 volte superiori rispetto ai ceppi non resistenti (Landner, 1971).

Infine, l'apporto microbico alla vaporizzazione dell'e

lemento contribuisce alla sua dispersione nell'ambiente, con le relative conseguenze dal punto di vista tossicologico.

BIBLIOGRAFIA

- Agnes G., Hill H.A.O., Pratt S., Risdale C., Kennedy F.S., Williams R.J.P. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 252, 207
- Aho I. (1968) *Husö Biol.Stat.Medd.*, 13, 5
- Anelli G., Pelosi P., Galoppini C. (1973) *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1579
- Araki T., Tojota S., Mizusawa J., Hanko E. (1965) *Japan Plant Protection Assoc.*, Tokyo, 10
- Bertilsson L., Neurjahr H.Y. (1971) *Biochemistry*, 10, 2805
- Borg K. (1958) *Nord. Veter.i Helsingfors*, 398
- Borg K., Wanntorp H., Erne K., Hanko E. (1965) *National Veterinary Inst.*, 5, 104, Stockholm 50 Stencils
- Borg K., Wanntorp H., Erne K., Hanko E. (1966) *J.Appl. Ecol. Suppl.*, 3, 171
- Borg K. (1967) *Oikos, Suppl.*, 9, 38
- Borg K. (1968) *Nord Veterinärmed i Helsingfors*, 398
- Borg K., Wanntorp H., Erne K., Hanko E. (1969) *Viltrevy*, 6, 299
- Bryant M.P., Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. (1967) *Arch. f.Mikrobiol.*, 59, 20
- Buhler D.R., Claves R.R., Shanks W.E. (1971) in Mercury in the Western Environmental Health Center Workshop, Oregon State University, Corvallis, Oregon, February 25 to 26
- Cavallito C.J., Bailey J.H., Haskell T.H., McCormick J.R., Warner W.F. (1945) *J.Bacteriol.*, 50, 61
- Challenger F. (1945) *Chem. Rev.*, 36, 315
- Clarkson T.W., Gatzky J., Dalton C. (1961) *Univ.of Rochester AEP Report n°582*
- Cook A.M., Steel K.J. (1959) *J. Pharmacol.*, 11, 162
- Dalal F.R., Rege D.V., Sreknivasan A. (1961) *Biochem.J.* 81, 317

- Galgaard-Mikkelsen P. (1969) Nord. Hyg.T., 50, 34
- Demis D.J., Rothstein A., Meier R. (1954) Arch. Biochem. Biophys., 48, 55
- De Simone R.E., Penley M.W., Charbonneau L., Smith S.G., Wood J.M., Hill H.A.O., Pratt J.M., Ridsdale S., R.J. P. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 304, 851
- Edelstam C., Johnels A.G., Olsson M., Westermark T. (1969) Nord. Hyg. T., 50, 14
- Fahmy F.Y. (1951) Thesis Univ. of Lund, Sweden
- Fimreite N. (1970) Environ. Pollut., 1, 119
- Fiskesjö G. (1969) Hereditas, 62, 314
- Fiskesjö G. (1970) Hereditas, 64, 142
- Fukunaga K., Tsukano Y. (1969) Residue Rev., 26, 2
- Furukawa K., Hill H.A.O., Pratt J.M., Risdale S., Williams R.J., Williams P. (1970) Agr. Biol. Chem., 33, 128
- Furukawa K., Tonomura K. (1971) Agr. Biol. Chem., 35, 604
- Furukawa K., Tonomura K. (1973) Agr. Biol. Chem., 36, 217
- Galoppini C. (1974) Agr. Ital. ( In corso di stampa)
- Gruenwedel D.W., Davison N. (1966) J. Mol. Biol., 21, 129
- Hansen H.J. (1965, a) Sven. Vet. T., 20, 1
- Hansen H.J. (1965, b) Royal Swedish Ministry of Agriculture, Stockholm
- Häsänen E., Sjoblom V. (1968) Kalatalous, 36, 5
- Hill H.A.O., Pratt J.M., Risdale S., Williams F.R., Williams P. (1970) Chem. Commun., 6, 341
- Irukayama K., Tajima S., Fujiki M. (1967) Jap. J. Hyg., 22, 392
- Jensen S., Jernelöv A. (1969) Nature, 223 753
- Jensen S., Jernelöv A. (1972) Int. At. Energy Agency, Tech. Rep. Ser. n°137 (cap. 4)
- Jernelöv A. (1974) W.H.O. (World Health Org.) Rep. (In corso di stampa)
- Jervis R.E., Debrun D., LePage W., Tiefenbach B. (1970) Dept. of Chemical Engineering and Applied Chemistry of Toronto, Toronto, 181, Canada
- Johnels A.G., Westermark T., Berg W., Persson P.L., Sjöstrand B. (1967) Oikos, 18, 323

- Johnels A.G., Westermark T. (1969) in Chemical Fallout, Current Research on Persistent Pesticides. (Miller M.W. and Berg G.G. eds.) vol.III, p.221, C.C. Thomas, Springfield
- Komura I., Izaki K., Takahashi H. (1970) *Agr. Biol.Chem.* 34, 480
- Komura I., Izaki K. (1971,a) *Jap.J.Biochem.*, 70, 885
- Komura I., Funada T., Izaki K. (1971,b) *Jap.J. Biochem.*, 70, 895
- Kondo I., Ishikawa T., Nakahara H. (1974) *J. Bacteriol.*, 117, 1
- Kurland L.T., Faro S.N., Siedler H. (1960) *World Neurol.*, 1, 370
- Landner L. (1971) *Nature*, 230, 452
- Levan A. (1945) *Nature*, 156, 751
- Lezius A.G., Barker H.A. (1965) *Biochemistry*, 4, 510
- Loutit J.S. (1970) *Gen.Res.*, 16, 179
- Makarova L.G., Nesmeyanov A.N. (1967) in Methods of element-organic Chemistry. North Holland Publ.Co., Amsterdam, 4, 337
- McBride B.C., Wolfe R.S. (1971) *Biochemistry*, 10, 4312
- McCalla T.M. (1940) *J.Bacteriol.* 40, 23
- Moriya S., Tomizawa C., Suwanai M. (1965) *Japan Plant Protection Assoc.*, Tokyo, 5
- Novick R.P. (1967) *Fed. Proc.*, 26, 29
- Okada M., Oharazawa H. (1967) in Report on the cases of mercury poisoning in Niigata, Ministry of Health and Welfare, Tokyo, Stencils, 63
- Owens R.G. (1953) in Metabolic Inhibitors (Hochster R. M. and Quastel J.H. eds.) vol.2, 1963, 264
- Passow H., Rothstein A., Loewenstein B. (1959) *J.Gen. Physiol.*, 43, 97
- Passow H., Rothstein A. (1960) *J.Gen.Physiol.*, 43, 621
- Pelosi P., Galoppini C. (1973) *Atti Soc. Tosc.Sci.Nat. Mem.*, Serie A, 80, 215
- Ramel C. (1967) *Hereditas*, 57, 445
- Ramel C. (1969) *Hereditas*, 61, 208



- Ramel C., Magnusson J. (1969) *Hereditas* 61, 231
- Ramel C. (1970) *Abstr. 1st Ann.Meet.Env.Mutag.Soc.*, 22
- Ramel C., Magnusson J. (1971) *Abstr.Soc.Europ.Drps.Conf.*
- Richmond M.H., John M. (1964) *Nature*, 202, 1360
- Robson J., Fenn P. (1961) *Nature*, 186, 501
- Rothstein A. (1954) in *Protoplasmologia* (Heilbrum L.V. and Weber F. eds.) II, E 4,1, Springer-Verlag, Wien
- Rothstein A. (1955) in *Electrolytes in Biological System* (Shanes A.M. ed.) vol.65, Amer. Physiol. Soc., Washington, D.C.
- Rothstein A. (1966) Univ. of Rochester AEP Report, n°468
- Ross R.G., Stewart D.K.R. (1962) *Can. J. Plant.Sci.*, 42, 280
- Ross R.G., Stewart D.K.R. (1964) *Can. J. Plant.Sci.*, 44, 123
- Sass J. (1937) *Phytopathology*, 27, 95
- Schrauzer G.N., Weber J.T., Beckhn T.M., HOLL R.K.Y. (1971) *Tetrahedron Lett.*, 3, 275
- Selhub J., Burton E., Sakami W. (1968) *Fed. Proc.* 28, 352
- Sjoblom V., Hasanen E. (1969) *Nord Hyg. T.*, 50, 37
- Smart N.A. (1964) *J. Sci. Food Agr.*, 15, 102
- Smart N.A. (1968) *Residue Rev.*, 23, 1
- Smith D.H. (1967) *Science*, 156, 1114
- Splanger W.J., Spigarelli J., Rose J.M., Miller H.M. (1973) *Science*, 180, 192
- Stutzenberger F.J., Bennett E.O. (1965) *Appl. Microbiol.*, 13, 570
- Stock A., Cucuel F. (1934) *Naturwiss.*, 22, 390
- Summers A.O., Lewis E. (1973) *J. Bacteriol.*, 113, 1070
- Summers A.O., Silver S. (1972) *J. Bacteriol.*, 112, 1228
- Summers A.O. (1974) *J. Bacteriol.* (In corso di stampa)
- Teruhito B., Arima K. (1969) *J. Bacteriol.*, 98, 888
- Tomizawa C. (1956) Kanto Division, *Phytopathol.Soc.Japan*, Tokyo, Dec. 15
- Tomomura K., Nakagami T., Futai F., Maeda K. (1968,a) *J. Ferm.Technol.*, 46, 506
- Tomomura K., Maeda K., Futai F. (1968,b) *J. Ferm.Technol.*, 46, 685

- Tonomura K., Kanzaki F. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 227
- Tonomura K., Kanzaki F. (1969) *J. Ferm. Technol.*, 47  
430
- Ueda K., Aoki H., Nishimura M. (1971) *Proc. 16th Int. Congr. Occup. Health, Tokyo, Sept. 22-27, 1969*, 557
- UI J., Kitamura S. (1971) *Pollut. Bull.*, 26, 56
- Umeda M., Saito K., Hirose K., Saito M. (1969) *J. Exp. Med.*, 39, 47
- Underdal B. (1969) *Nord. Hyg. T.*, 50, 60
- Westermarck T. (1965) in The Mercury Problem in Sweden.  
Royal Ministry of Agriculture, Stockholm, 25
- Westö G. (1967, a) *Acta Chem. Scand.*, 21, 1790
- Westö G. (1967, b) *Var. Foda*, 1, 1
- Westö G. (1968) *Acta Chem. Scand.*, 22, 2277
- Westö G. (1969, a) in Chemical Fallout. Current Research on Persistent Pesticides. (Miller M.W. and Berg G.G. eds.) C.C. Thomas, Springfield, vol. 3, p. 75
- Westö G. (1969, b) *Var. Foda*, 7, 137
- Westö G. (1969, c) *Nord. Hyg. T.*, 50, 67
- Westö G. (1970) *Var. Foda*, 9-10, 147
- Wilkes B.G., Palmer E.T. (1932) *J. Gen. Physiol.*, 16, 233
- Wood J.M., Kennedy S.F., Rosen C.G. (1968) *Nature*, 220, 173
- Wood J.M., Brown D.G. (1972) *Struct. Bonding*, 11, 47
- Wood J.M., Penley M.W., De Simone R.E. (1972) *Int. At. Energy Agency Techn. Rep. Ser. n°137 (cap. 5)*, 49
- Wood J.M., Wolfe R.S. (1966) *Biochemistry*, 5, 3598
- Wood J.M. (1974) *Science*, 183, 1049

IMPLICAZIONI ECOLOGICHE DELLE CONCIMAZIONI:  
EUTROFIZZAZIONE DELL'AMBIENTE E SCOMPENSI  
NEL CICLO DELL'AZOTO

Balloni W., Materassi R., Florenzano G.  
Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del  
C.N.R. presso l'Istituto di Microbiologia agraria  
e tecnica dell'Università degli Studi di Firenze.  
Direttore: Prof. Gino Florenzano

L'eutrofizzazione delle acque è divenuto un fenomeno allarmante e di proporzioni crescenti, come conseguenza, in apparenza paradossale, dell'inquinamento.

Del processo e delle relative implicazioni uno di noi (Florenzano, 1974) ha tracciato i principali aspetti e si rimanda perciò a tale rassegna per le conoscenze di base.

Qui si vuole segnalare e sottolineare il problema, che presenta due differenti matrici, urbano-industriale ed agricolo-zootecnica.

Le acque delle aree urbane ed industriali sono, come è noto, sempre più minacciate dal carico crescente di effluenti domestici e delle industrie, ivi compresi prodotti tossici e metalli (piombo, mercurio, cadmio).

Conseguenze paragonabili a quelle da congestione umana ed industriale nelle aree urbane sono esercitate dai rifiuti degli allevamenti zootecnici industriali, concentrati su aree ristrette, per i quali si propone la conversione in impianti di produzione di mangimi ed energia, secondo i moderni indirizzi del riciclo fotosintetico e microbiologico (Florenzano e Materassi, 1974).

Nelle aree ad agricoltura intensiva le acque superficiali e sotterranee subiscono inquinamento da pesticidi ed eutrofizzazione ad opera degli elementi nutritivi asportati dai terreni per erosione o per dilavamento. Il passaggio di elementi nutritivi dal suolo ai corpi idrici, ai quali

esso è legato dal ciclo dell'acqua, è un processo naturale dal quale dipende in larga misura la lenta evoluzione dei laghi verso condizioni eutrofiche. Ma il rapido incremento nel consumo di fertilizzanti, soprattutto azotati, ha grandemente aumentato il potenziale eutrofizzante dei terreni coltivati, i quali, oltre che vittime, sono divenuti, loro malgrado, protagonisti dell'inquinamento. Il problema delle conseguenze ecologiche dell'uso di elevate quantità di fertilizzanti chimici, oggetto di attenta considerazione in diversi paesi ad agricoltura progredita, non è ancora avvertito in Italia. Ma se si tiene conto che il consumo italiano di fertilizzanti azotati è passato da 1,7 milioni di tonnellate di azoto nel 1952 a 6,7 milioni nel 1972, sarebbe quanto mai opportuno iniziare, nelle aree più critiche, i rilevamenti per stabilire in quale misura l'agricoltura può arrecare danni ecologici.

Il problema che si pone è di sapere quale proporzione dei fertilizzanti somministrati ai suoli coltivati raggiunge le riserve d'acqua superficiale e le falde.

I fertilizzanti fosfatici incorporati nel terreno reagiscono rapidamente per formare nuovi composti poco solubili. Pertanto il fosforo viene asportato dai suoli coltivati in prevalenza dalle acque di scorrimento superficiale con le particelle di limo ed argilla. Anche se questa sorgente di fosforo risulta la meno assimilabile dalla microflora algale e quindi senza effetto eutrofizzante immediato, essa riveste, per la integrità biologica dei corsi idrici, una importanza crescente, in ragione della più intensa erosione del suolo provocata dai moderni metodi di lavorazione e coltivazione e dal decrescente tenore di humus dei terreni. Wadleigh (1968) calcola che almeno il 50% dei sedimenti fluviali negli Stati Uniti deriva dai terreni agrari, i quali perdono in media oltre 20 tonnellate di suolo/ettaro/anno.

Diverso è il problema per l'azoto. Tutte le

forme chimiche di questo elemento introdotte nel terreno con i fertilizzanti entrano nel complesso ciclo microbiologico, che, in condizioni normali di pH ed aereazione, conduce, nel giro di poche settimane dalla concimazione, alla produzione di azoto nitrico solubile e mobile secondo i movimenti dell'acqua nel suolo (Florenzano, 1972 a; Florenzano e Materassi, 1968).

Da ciò discende che l'azoto dei fertilizzanti non influenza necessariamente l'ambiente in misura diversa da quella dell'azoto proveniente da altre fonti, poichè lo ione nitrico rappresenta il punto di arrivo tanto dell'azoto dei resti animali, vegetali e dell'humus, quanto di quello dei fertilizzanti ammoniacali. La differenza sta solo nel tasso di formazione degli ioni nitrici (istantanea nel caso di concimazioni nitriche, abbastanza rapida nel caso di concimazioni ammoniacali e relativamente lenta quando avviene a spese di azoto organico), che influisce sulla percentuale di utilizzazione dell'azoto da parte delle colture.

In tali termini si pone il cosiddetto "problema dei nitrati" in ecologia.

Una valutazione degli effetti ecologici dell'impiego dei fertilizzanti azotati deve tener conto tanto dei delicati equilibri sui quali tale ciclo si fonda quanto delle interferenze chimiche alle quali esso può andar soggetto, con particolare riferimento alla sempre crescente possibilità di accumulo di nitriti per la naturale sproporzione fra batteri nitrosi e nitrici, per la maggiore sensibilità dei secondi alle inibizioni da pesticidi (Florenzano, 1972 a; Nuti e Verona, 1973), oltre che per l'intervento di processi, quali la nitrificazione eterotrofa e la chemiodenitrificazione, che portano alla formazione di composti azotati tossici.

La crescente presenza di acido nitroso in natura è la conseguenza complessa di numerosi fattori (azione di inibitori selettivi, interferenza di processi chimici e microbiologici ad effetto deviante) ed è l'indice di uno squili-

brio che rischia di compromettere la stessa integrità del ciclo dell'azoto.

Nella figura 1 è riportato uno schema dei meccanismi biochimici e microbiologici ai quali si deve la genesi dei nitriti e dei composti nitrosi nel suolo e nelle acque, redatto alla luce delle attuali conoscenze.

La riduzione assimilativa dello ione nitrico operata da gran parte dei microrganismi procarioti ed eucarioti secondo la via indicata come m, n, o, conduce, in condizioni fisiologiche, direttamente alla formazione di ammoniaca. Finora non sono state raccolte prove che in natura questo processo, o la nitrato riduttasi B che ad esso partecipa, dia luogo ad accumulo di nitrito.

Viceversa, la riduzione dissimilativa, di cui sono capaci le forme batteriche elencate nella tabella 1 e che segue la via indicata come a, b, c, d, e, rappresenta la fonte principale dei nitriti prodotti nel suolo e nelle acque, perchè molte forme batteriche riducono il nitrato a nitrito, ma non contengono gli enzimi per la riduzione di quest'ultimo, senza contare che anche i veri denitrificanti accumulano transitoriamente nitriti, a causa della attivazione sequenziale degli enzimi della denitrificazione (Payne, 1973). Và infine ricordato che talune specie batteriche formano, come prodotto finale della riduzione dissimilativa del nitrato, ossido nitroso anzichè azoto elementare.

Un alto contenuto in nitrati e nitriti nelle acque comporta molti pericoli per la salute dell'uomo. Quantità di azoto nitrico superiori a 10 mg/litro sono considerate nocive specialmente per i neonati. I nitriti sono tossici perchè reagiscono con l'emoglobina ed esercitano effetti mutageni a seguito di interazioni chimiche con le basi azotate degli acidi nucleici (Florenzano, 1972 b).

Ma la pericolosità dei nitriti sta nel fatto che essi in natura subiscono processi che possiamo definire di "organicazione" e che conducono alla sintesi di una serie di prodotti altamen

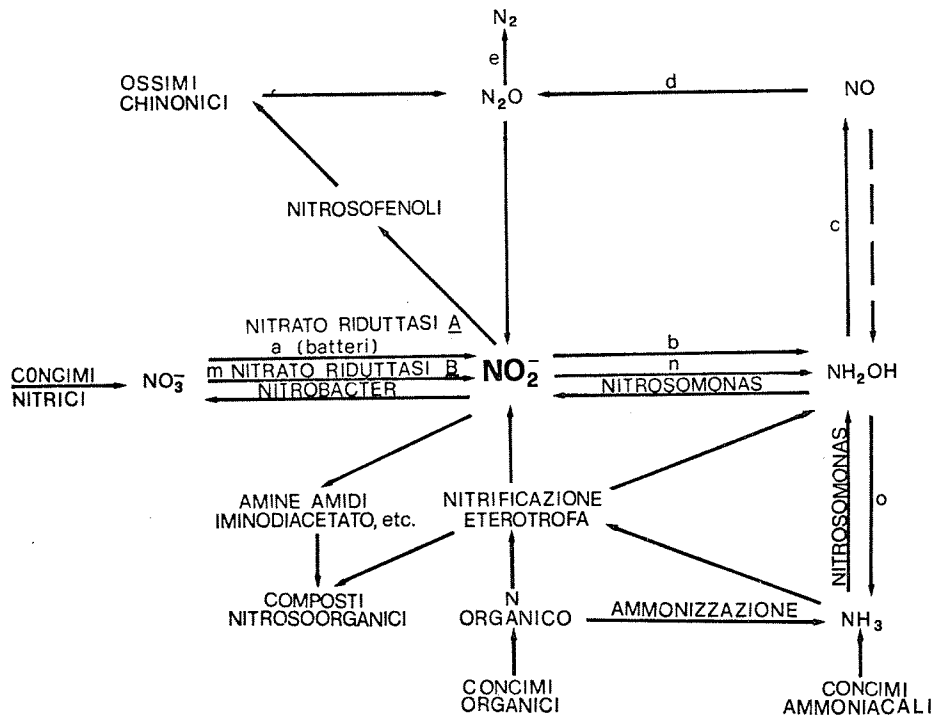


Figura 1 - Schema delle vie biochimiche e microbiologiche responsabili della genesi ed accumulo di nitriti e composti nitrosi in natura.

in-  
 lei  
 quali  
 lla  
 itrico  
 occario  
 ne m,  
 diret  
 ra non  
 esto  
 esso  
 o.  
 di  
 te nel  
 ome a,  
 e dei  
 perchè  
 a ni-  
 ridu  
 anche i  
 mente  
 ziale  
 e, 1973).  
 beriche  
 ione  
 anzi-  
 i nel-  
 alute  
 riori  
 cial-  
 ci per  
 tano  
 chimi  
 ici  
 l fat-  
 che pos  
 conduco  
 altamen

te tossici (nitrosamine, nitrosamidi, nitrosofenoli), per reazione dello ione nitroso con amine primarie e secondarie, con composti fenolici, etc.

La formazione di nitrosofenoli avviene nel terreno e nelle acque e rappresenta una deviazione dai normali processi di umificazione, le cui conseguenze a lungo termine sono ancora da valutare (Florenzano, 1972 b).

Produzione di nitrosamine (composti altamente cancerogeni, mutageni e teratogeni, essenzialmente per la loro capacità alchilante mediata da formazione di diazometano), può aversi non solo nei cibi trattati con nitriti, ma anche nell'ambiente, per reazione puramente chimica ma soprattutto per attività microbica e, a seguito di ingestione di nitriti, nel tratto intestinale degli animali, parte per l'azione catalitica dello ione tiocianato della saliva e parte ad opera della microflora intestinale.

Fra gli altri meccanismi di formazione di nitrosamina è interessante citare la combinazione di nitrito ed imminodiacetato, questo ultimo derivato dall'acido nitrilotriacetico (NTA) usato in sostituzione dei polifosfati nei detergenti allo scopo di diminuire l'azione eutrofizzante degli effluenti domestici.

Secondo Verstraete ed Alexander (1973) alla nitrificazione eterotrofa è collegata la produzione di composti tossici dell'azoto, quali nitriti, idrossilamina e composti nitroso-organici. Di ciò va tenuto conto nella valutazione della opportunità di ricorrere alla deliberata inibizione della nitrificazione autotrofa per limitare le perdite di nitrati del suolo.

Questi sono alcuni dei motivi che hanno indotto a considerare con attenzione l'origine dei composti azotati nelle acque ed il ruolo delle attività agricole nella eutrofizzazione delle acque superficiali e sotterranee (Nicholson et al., 1966). Una breve rassegna dei dati raccolti nell'ultimo decennio in diversi Paesi europei ed americani permette di affermare che, già oggi, i composti azotati dilavati dai suoli coltivati e-



Tabella 1 - Generi di batteri chemiotrofi contenenti specie capaci di ridurre dissimilativamente il nitrato o di denitrificare (Payne, 1973)

respiranti il nitrato ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ )	
Achromobacter	Leptothrix
Actinobacillus	Micrococcus
Aeromonas	Micromonospora
Agarobacterium	Mycobacterium
Agrobacterium	Nocardia
Alginomonas	Pasteurella
Arizona	Propionibacterium
Arthrobacter	Proteus
Bacillus	Providencia
Beneckeia	Pseudomonas
Brevibacterium	Rettgerella
Cellulomonas	Rhizobium
Chromobacterium	Salmonella
Citrobacter	Sarcina
Corynebacterium	Selenomonas
Cytophaga	Serratia
Enterobacter	Shigella
Erwinia	Spirillum
Escherichia	Staphylococcus
Eubacterium	Streptomyces
Flavobacterium	Vibrio
Haemophilus	Xanthomonas
Halobacterium	
Denitrificanti ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ )	
Achromobacter	Moraxella
Alcaligenes	Nitrosomonas (°)
Bacillus	Propionibacterium
Chromobacterium	Pseudomonas
Corynebacterium	Spirillum
Halobacterium	Thiobacillus
Hyphomicrobium	Xanthomonas
Micrococcus	

(°) Il ruolo fisiologico della riduzione del nitrito ad ossido nitroso e nitrico in questi batteri non è stato ancora chiarito.

sercitano effetti ecologici importanti in molte regioni della terra e di prevedere che, perdurando l'attuale tendenza nel consumo di concimi, tali effetti diverranno sempre più gravi e generalizzati.

Per quanto riguarda le acque superficiali, è stato valutato che il 95% dell'azoto dei corsi d'acqua lontani da centri urbani ed insediamenti industriali proviene dal dilavamento dei terreni agrari. Aldrich (1972) osserva che il contenuto in nitrati di molti fiumi americani ha subito nell'ultimo decennio un generale aumento; per diversi corsi d'acqua dell'Illinois è risultata evidente la correlazione fra aumento del consumo di concimi azotati ed incremento del tenore in nitrati delle acque. Rhoades e Bernstein (1971) riportano dati assai eloquenti circa il contenuto in azoto, soprattutto nitrico, delle acque percolanti dai terreni irrigati (da 0,8 a 29 mg di azoto/litro a seconda dei terreni e se si tratti di acque di ruscellamento o percolazione).

Accumulo di nitrati nel sottosuolo a seguito di abbondanti concimazioni azotate è stato ripetutamente osservato (Smith, 1968; Bonke e Welk, 1971). Rilievi del contenuto in azoto delle acque del sottosuolo nella San Joaquin Valley (California), hanno dato valori medi di 25 mg/litro, con punte di 62 mg/litro, dimostrando che in taluni casi si ha il dilavamento di una parte rilevante dell'azoto somministrato con le concimazioni. Per quanto riguarda il disperdimento di azoto nel sottosuolo di terreni irrigati Rhoades e Bernstein (log.cit.) riportano stime oscillanti fra 8 e 186 Kg di azoto/ettaro/anno, con conseguente accumulo di azoto nelle falde. Queste, una volta inquinate, possono rimanere tali per decenni. In Israele, le cui risorse d'acqua dolce sono in gran parte costituite da due falde acquifere, l'inquinamento delle acque sotterranee con composti azotati è oggetto di un vasto programma di studio e di controllo (Chen Saliternik,

1973). E' stato valutato che il dilavamento di azoto nitrico dai terreni fornisce 18.000 tonn. d'azoto delle circa 23.000 tonn. che annualmente migrano dalla superficie terrestre verso le falde sotterranee.

L'alternativa dei pericoli prospettati non può essere rappresentata da un minor consumo di concimi azotati, ma da un mutamento generale negli indirizzi agronomici che tenga conto della necessità di conciliare le esigenze della produzione agraria con quella di limitare l'inquinamento da composti azotati.

Alcune delle possibilità agronomiche da prendere in considerazione per raggiungere questo scopo sono: (1) maggiore impiego di colture intercalari per assorbire i nitrati che si formano in assenza delle colture principali; (2) impiego di inibitori della nitrificazione, da consigliare dopo che siano escluse le possibilità di effetti secondari sfavorevoli; (3) somministrazione dei concimi all'epoca della loro massima utilizzazione; (4) impiego di concimi cosiddetti "a lento effetto".

Infine, vanno tenute presenti le nuove prospettive offerte dalla azotofissazione biologica.

Fattorie miniaturizzate a livello aziendale, rappresentate da colture di alghe verdi-azzurre da distribuire ai terreni, potrebbero contribuire a conciliare agricoltura ed ecologia.

La dimostrata possibilità di trasportare il genoma microbico della azotofissazione oltre la barriera intraspecifica apre prospettive di portata oggi incalcolabile, con la creazione di nuove specie batteriche azotofissatrici e di nuove simbiosi azotofissatrici per colture foraggere e cerealicole.

Tali possibilità acquistano maggiore rilievo anche alla luce della attuale crisi energetica, che impone una revisione generale nei consumi, oltre che nella prospettiva di limitare quelle perdite di elementi nutritivi inevitabili nei

la attuale prassi agronomica.

BIBLIOGRAFIA

- Aldrich S.R. (1972) Bioscience. 22, 90
- Bonke A.A., Welk L.F. (1971) Agron. Abstr.Am. Soc. Agron. 150
- Florenzano G. (1972 a) Elementi di microbiologia del terreno. Reda, Roma
- Florenzano G. (1972 b) Atti del XVI Congr. Naz. Microbiol. 1, 227
- Florenzano G. (1974) Conf. presso il Botanische Institute Univ. Vienna 28 maggio
- Florenzano G., Materassi R. (1968) Atti del Col. Naz. sull'Azoto in agricoltura, p.214, Roma
- Florenzano G., Materassi R. (1974) IX Simp.Int. Zoot. Milano, 15-17 aprile
- Nicholson H.P., Grzenda A.R. & Teasley J.L. (1968) in Agricultural waste water (Soneen L.D. Ed.) Water. Res.Center Univ.Calif., 132
- Nuti M.P., Verona O. (1973) L'Agric. Ital. 73, 223
- Payne W.J. (1973) Bact. Rev. 37, 409
- Rhoades J.D., Bernstein L. (1971) in Water and water pollution handbook (Ciaccio L.L. Ed.), 1, p.141, Marcel Dekker Inc., New York
- Saliternik C. (1973) in Advances in water pollution research (Jenkins S.H. Ed.), p.171, Pergamon Press, Oxford
- Smith G.E. (1968) Water pollution as related to agriculture. Seminar University of Missouri and Missouri Water pollution Board
- Verstraete W., Alexander M. (1973) Environ. Sci. Technol. 7, 39
- Wadleigh C.H. (1968) U.S. Dept. Agr. Misc.Publ., 1065

IL PASSAGGIO DI FOSFORO E DI AZOTO A  
CORPI D'ACQUA "AGRARI" SUPERFICIALI  
DAI TERRENI E DAI SEDIMENTI DI FONDO

Candussio R., Visintini Romanin M.

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante -  
Sezione di Gorizia

La presente comunicazione vuol essere semplicemen-  
te una schematica relazione informativa sul passaggio  
di P e di N a corpi d'acqua "agrari" superficiali dai  
terreni e dai sedimenti di fondo.

Presso la Sezione di Gorizia dell'Istituto Speri-  
mentale per la Nutrizione delle Piante stiamo attiva-  
mente lavorando su diversi temi riguardanti l'inquina-  
mento del terreno: (1) ricerche su alcuni fattori (con-  
cimazioni fosfatiche e organiche, calcitazioni) che  
possono interferire sull'assorbimento del P del ter-  
reno da parte di varie piante agrarie; (2) ricerche  
sulla formazione di metil-mercurio per transmetilazio-  
ne tramite le cobalamine del terreno nelle condizioni  
di terreni agrari normalmente drenati e aereati e nel-  
le condizioni di terreni agrari sommersi; (3) ricer-  
che sul passaggio di P e di N dai terreni alle acque  
e conseguenti effetti di eutrofizzazione sulle acque  
stesse.

Le ricerche sui primi due argomenti sono ancora in corso e i risultati finora ottenuti non sono sufficienti a trarre conclusioni di carattere definitivo.

Per quanto riguarda il terzo tema - N e P di origine agraria come fattori di eutrofizzazione di corpi di acqua - le ricerche, per quanto non ancora del tutto ultimate, hanno però già fornito interessanti risultati dei quali si vuol qui brevemente riferire.

Innanzitutto, al fine di indicare i limiti del nostro studio e di non creare erronee interpretazioni, riteniamo opportuno premettere alcune precisazioni e alcune definizioni. Usiamo l'attributo di "agrari" per quei corpi d'acqua (a) che convogliano acque di colatura di bacini di bonifica (ossia canali di bonifica); (b) che portano acque usate per irrigazione (ossia canali di irrigazione); (c) che sono corsi d'acqua naturali che non ricevono scarichi industriali ma solamente, o precipuamente, scarichi "agrari" e scarichi di insediamenti rurali.

Consideriamo i sedimenti recenti dei corpi d'acqua - secondo le definizioni di Mortimer (1949) e di Ponnampuruma (1972) - come "terreni subacquatici" (subaquatic soils, underwater soils) o "terreni di accumulo permanentemente sommersi". Non c'è dubbio alcuno che in questi sedimenti si svolgono le stesse attività chimiche e microbiologiche dei terreni sommersi ritenuti come terreni "indiscutibilmente agrari", come per esempio i terreni sommersi di risaia. Si ritiene perciò pienamente giustificata la adozione dei metodi di indagine impiegati per i terreni agrari sommersi anche per lo studio dei fenomeni chimici e fisico-chimici che si verificano nell'inquinamento dei sedimenti, inquinamenti che governano, per buona parte e almeno per certi inquinanti, la "qualità" delle acque sovrastanti. Sola-

mente con un accurato studio dei sedimenti ci si potrà rendere ragione della vera entità e durata dell'inquinamento delle acque in dipendenza della fissazione e della mobilizzazione degli inquinanti che hanno raggiunto i sedimenti stessi.

Il nostro studio tende a raggiungere i seguenti scopi:

- 1) valutazione degli apporti agrari di elementi direttamente inquinanti dai terreni ai corpi d'acqua sia superficiali che sotterranei;
- 2) valutazione del ruolo dei sedimenti di corpi d'acqua "agrari" sul potere eutrofizzante delle acque e sui meccanismi degli scambi fra sedimenti e acque;
- 3) bilancio di P e di N in bacini di colatura di bonifica.

Lo studio è stato rivolto ai terreni e alle acque della media e bassa pianura del Friuli centrale.

La zona interessata, riportata nella cartina della figura 1, ha, sommariamente, le caratteristiche seguenti:

- alta e media pianura costituita da terreni ferrettizzati di debole spessore, poggianti su una coltre alluvionale ghiaiosa, molto permeabili, con libero drenaggio, con elevata capacità di fissazione per i fosfati, dotati di una attività microbiologica molto elevata (forte potere di nitrificazione), con fenomeni di ossidazione molto accentuati (rapida mineralizzazione della sostanza organica) catalizzati dalla presenza di abbondanti ossidi di Fe e di Mn;
- bassa pianura caratterizzata da terreni calcarei (o calcareo-dolomitici) con tessitura prevalentemente limo-argillosa, poco permeabili, piuttosto frigidati, mal drenati. La parte litoranea è dominata da terreni organici di recente bonifica idraulica;

- tra la media e la bassa pianura esiste una zona di affioramento di acque (zona delle risorgive), molto abbondanti, provenienti dalle falde freatiche della sovrastante pianura alimentate sia dalla percolazione di acque meteoriche sia dalla dispersione subalvea di corsi d'acqua (le figure 2 e 3 illustrano schematicamente la situazione).

Le ricerche sono state rivolte ai tre seguenti argomenti:

Argomento I°

La qualità delle acque freatiche che possono contenere elementi inquinanti provenienti dalla percolazione di acque attraverso i terreni ferrettizzati della sovrastante pianura. E' stata controllata l'acqua di una fitta serie di pozzi, disposti immediatamente a monte della linea delle risorgive, e destinati a pompare acque freatiche per scopi irrigui e per usi aziendali agrari (Consorzio pozzi della Stradalta).

I risultati hanno messo in evidenza:

- a) assenza, o bassissimi e trascurabili tenori, di fosfati;
- b) presenza di nitrati, in quantità non elevatissima pur tuttavia allarmante. Alcune ricerche collaterali avrebbero accertato l'origine "agraria" dei nitrati delle acque di risorgiva. Tali ricerche hanno riguardato: la composizione chimica delle acque di inalveazione profonda di corsi d'acqua; il tenore di nitrati lungo il profilo di terreni ferrettizzati in diverse stazioni della media pianura; il confronto di analisi chimiche eseguite alcune decine di anni fa dalla ex Stazione Chimico Agraria Sperimentale di Udine sulle stesse acque di risorgiva; l'abnorme presenza, e non certo rara, di nitrati in diverse colture da foraggio - spe-



cialmente mais - effettuate nella pianura ferretiz-  
zata. Dato l'impiego misto di queste acque (oltre  
che irrigue, anche aziendali come acque di abbeve-  
rata e acqua potabile per insediamenti umani rura-  
li) è facile arguire la pericolosità di questo in-  
quinamento anche se, per ora almeno, non è di imme-  
diata preoccupazione. Le accertate bassissime con-  
centrazioni di iodio nelle acque esaminate e la  
presenza di nitrati, considerati come fattori gozzi  
geni, pongono particolari problemi di igiene alimen-  
tare non solo zootecnica ma anche umana.

E' in corso una sperimentazione di pieno campo  
tendente a valutare le perdite di azoto per percola-  
zione sotto diversi regimi colturali in terreno fer-  
rettizzato (quantità e qualità di concimi azotati,  
volumi di adacquamento, tipi di colture).

#### Argomento II°

Elementi eutrofizzanti (P, N e C) nelle acque di co-  
latura di bacini di bonifica. E' stata studiata la di-  
namica degli scambi tra sedimenti e acque, e la dinami-  
ca delle forme chimiche di N e di P in relazione alle  
caratteristiche chimiche, fisiche e mineralogiche dei  
sedimenti e ai fenomeni di ossido-riduzione nell'inter-  
no dei sedimenti e nell'interfaccia sedimento-acqua.

I risultati medi delle forme chimiche di N e di P  
riportati nelle Tabelle 1, 2, 3 permettono di fare al-  
cune interessanti osservazioni e cioè:

- nei sedimenti il P organico rappresenta nella media  
generale circa il 20% del P totale: nei terreni dei  
bacini di colatura il P organico rappresenta in me-  
dia oltre il 50% del P totale. Evidentemente la li-  
berazione del P legato alla sostanza organica è mol-

to più accentuata nei sedimenti;  
- la parte maggiore, il 65-70% in media, del P inorganico è legata al Ca. I sedimenti sono calcarei (il contenuto medio di  $\text{CaCO}_3$  è del 39%). Tuttavia una notevole parte del P inorganico è legata al Fe e all'Al (sia nelle forme libere che nelle forme occluse). Evidentemente lo stato ridotto dei sedimenti (ma non di tutti: i valori del potenziale di ossido-riduzione ( $E_h$  corretto a pH 7) dimostra infatti una notevolissima ampiezza di variazioni: da un max di mV +396 a un min di mV -25) mobilizzando il Fe mobilizza anche i fosfati. Il frazionamento del P inorganico, eseguito con il metodo di Chang e Jackson, dà infatti ragione di questo comportamento dei fosfati.

Lo stato di ossido-riduzione dei sedimenti più recenti (quelli da noi esaminati) è in stretta relazione alla quantità di sostanza organica presente nel sedimento stesso e quindi con lo spessore dello strato ossidato nell'interfaccia sedimento-acqua (trattandosi di acque, per la maggior parte, e nel momento del campionamento ancora sufficientemente ossigenate).

Il P solubile nell'acqua interstiziale dei sedimenti è alquanto elevato (in media ppm 3.129): subisce (al momento del campionamento) nelle acque sovrastanti una diluizione che porta il tenore del P solubile a 0.542 ppm. Ovviamente queste acque, nella diluizione attuata nel momento del campionamento, hanno un tenore fosfatico molto elevato relativamente ai presunti limiti di sicurezza per una eutrofizzazione delle acque (ppm 0.020 espresso in P).

E' evidente che la massima parte del P dei sedi-

menti, se non proprio completamente tutto, deve provenire da fenomeni di erosione dei terreni dei bacini di bonifica.

Questo ultimo particolare aspetto è oggetto di una ricerca che è attualmente in corso: dinamica stagionale dei contenuti in P, N e C delle acque e delle sostanze in sospensione nei canali di alcune bonifiche della Bassa friulana.

Nella relazione, che è in corso di pubblicazione, sono riferite diverse altre situazioni emerse nelle ricerche eseguite fino ad ora.

### Argomento III°

Le stesse ricerche, e la stessa impostazione, effettuate nello svolgimento dell'argomento precedente (inquinamento "agrario" dei canali di bonifica) sono state condotte nello studio di un corso d'acqua naturale (di risorgiva: Fiume Stella) praticamente non inquinato da scarichi industriali, con acque, all'origine, molto pure e ben ossigenate (media 90% di saturazione). L'insediamento di un forte numero di allevamenti ittici (trotiere) ha creato preoccupazioni di possibili inquinamenti eutrofizzanti. La cartina della figura 4 (Musi, 1973) illustra la situazione degli allevamenti ittici sorti, per la massima parte, in questi ultimi anni.

I risultati analitici, di maggior interesse per il tema qui esposto, illustrati nelle Tabelle 4, 5, 6 e 7 si prestano a diverse considerazioni sulla dinamica del P e dell'N (e secondariamente del C org. e del S) nei sedimenti, nelle acque e negli scambi fra sedimenti e acque e viceversa.

Si riferiscono qui soltanto le conclusioni prati-

che riguardanti il presunto inquinamento delle acque eventualmente causato dagli allevamenti di trote. Nelle acque a valle delle trotiere di recente impianto e lungo il corso del fiume fino al suo sbocco nella laguna, l'inquinamento eutrofizzante di N e di P non dà preoccupazioni attuali: infatti predomina ancora il movimento di P e di N dalle acque ai sedimenti. Ossia le acque si impoveriscono e i sedimenti si arricchiscono continuamente di P, in vario modo fissato (adsorbimento, precipitazioni, occlusioni), e di N. Le acque interstiziali dei sedimenti sono però già molto ricche di P in soluzione. A valle delle trotiere di vecchio impianto (oltre 20 anni) la situazione è molto diversa: predomina colà il movimento del P (e dell'N) dai sedimenti alle acque. Questa situazione può trovare ragionevole spiegazione nei seguenti fenomeni rilevati nelle nostre ricerche. L'accumulo di N organico è molto più accentuato nei sedimenti a valle delle trotiere vecchie: infatti l'N organico è qui 280 volte più elevato dell'N organico medio del corso del fiume. Il C organico è di circa 100 volte più elevato. Tutte le forme di P sono eccezionalmente elevate. Il rapporto C/N indica o che è avvenuta una demolizione maggiore della sostanza organica, oppure che la sostanza organica originale è di natura notevolmente diversa da quella degli altri sedimenti. Lo stato di riduzione è notevolmente più basso della media di tutti gli altri sedimenti ( $E_h$  corretto a pH 7 è di mV -31). In tale situazione è evidente che lo strato di ossidazione tra acque (ben ossigenate) e sedimenti o non si forma affatto o, tutt'al più, è di irrilevante spessore. Il che comporta: (a) aumento della solubilità dei fosfati (quelli legati al Fe per riduzione del Fe; quelli legati al Ca per effetto di una diminuzione localizza

ta del pH causata da una maggior quantità di  $\text{CO}_2$  nei sedimenti calcarei; quelli adsorbiti su Al e su argille, per scambio con anioni organici); (b) aumento dell' $\text{NH}_4$  in soluzione (in equilibrio con l' $\text{NH}_4$  adsorbito) e conseguente diminuzione dell' $\text{NO}_3$  anche nelle acque di superficie ben ossigenate (forse anche perdite di N gassoso, tuttavia non accertate nelle nostre indagini).

Tutto ciò porta alla conclusione pratica che le trote dopo un periodo di attività sufficientemente lungo lasciano dei sedimenti (sostanza organica per eccedenza di mangimi e per accumulo di prodotti del metabolismo di una popolazione di centinaia di migliaia di trote, ecc.), sedimenti pericolosi per l'eutrofizzazione sia del fondo dei corsi d'acqua (e quindi di rigoglio di piante acquatiche ancorate sui fanghi) sia delle acque superficiali (e quindi moltiplicazione eccessiva ed esplosiva di alghe). In conseguenza della sensibile velocità delle acque, e anche della loro notevole massa, l'eutrofizzazione fa sentire i suoi effetti con lentezza, dapprima con la deposizione di sedimenti (un tempo questi corsi d'acqua di risorgiva non avevano fanghi di fondo), successivamente con l'ancoraggio di piante acquatiche superiori ed infine - in determinate zone allargantesi più o meno velocemente - con il rigoglio di alghe. Oggi siamo ancora nella fase iniziale: lo sviluppo futuro dipenderà dai provvedimenti che si vorranno prendere, atti ad arrestare in tempo il fenomeno dell'eutrofizzazione causata dall'arricchimento dei sedimenti.

BIBLIOGRAFIA

- Broili L., (1973) in La trotticoltura. Ritratto di una attività produttiva. 7-16, Assoc.Piscicolt. It., Treviso
- De Marchi G., (1931) in Progetto di massima per la trasformazione fondiaria del comprensorio. 13-124, Consorzio per la trasformazione fondiaria della Bassa Friulana edit.), Stab. La Presse, Milano
- Mortimer C.H., (1949) *J. Soil Sci.* 1, 63-73
- Musi F., (1973) in Piscicoltura e ambiente nella Zona delle Risorgive con particolare riguardo al Basso Codroipese. 2, 1-51, Università degli Studi di Trieste, Istituto di Geografia, Udine
- Ponnamperuma F.N., (1972) in Advances in Agronomy, 24, (Brady, N.C. edit.), 29-88, Academic Press, New York

TABELLA 1 - Canali di bonifica (idrovore). Forme di azoto nei sedimenti e negli strati d'acqua a contatto coi sedimenti (dati espressi in ppm)

	sedimenti					acque							
	min	max	M	$\pm$	E	$C_v$	min	max	M	$\pm$	E	$C_v$	
N - NH <sub>4</sub>	idros.	1.40	3.85	2.45	$\pm$	0.21	29	1.40	3.85	2.45	$\pm$	0.21	29
	adsorb.	48.65	120.83	75.31	$\pm$	5.92	27	=	=	=		=	
	fissato	62.47	178.80	123.34	$\pm$	10.75	30	=	=	=		=	
	totale	113.92	266.30	201.10	$\pm$	14.90	25	1.40	3.85	2.45	$\pm$	0.21	29
N - NO <sub>2</sub>	0.01	0.14	0.065	$\pm$	0.008	47	0.002	0.079	0.034	$\pm$	0.008	77	
N - NO <sub>3</sub>	1.83	9.24	4.02	$\pm$	0.69	59	0.54	2.59	1.57	$\pm$	0.28	62	
N - inorg. totale	117.40	277.64	205.18	$\pm$	15.20	25	1.97	6.76	4.06	$\pm$	0.45	38	
N - org.	763.60	3927.79	2238.14	$\pm$	266.62	41	0.11	3.50	1.06	$\pm$	0.28	92	
N - totale	880.00	4200.00	2443.33	$\pm$	278.69	39	3.88	7.76	5.12	$\pm$	0.47	32	

- 115 -

TABELLA 2 - Canali di bonifica (idrovore). Forme di fosforo nei sedimenti e negli strati d'acqua a contatto coi sedimenti (dati espressi in ppm)

	sedimenti					acque						
	min	max	M	±	E	C <sub>v</sub>	min	max	M	±	E	C <sub>v</sub>
P in soluz.	totale	=	=	=	=	=	0.085	2.731	0.598	±	0.23	136
	organico	=	=	=	=	=	0.001	0.220	0.056	±	0.017	106
	inorg.:											
	-ortof.	=	=	=	=	=	0.044	2.728	0.542	±	0.232	148
	-polif.	=	=	=	=	=	praticam.		assenti (1)			
P inorg. tot.	(2) 0.218	(2) 13.638	(2) 3.129	±	1.195	132	0.044	2.728	0.542	±	0.232	148
P solub. in:												
-HNO <sub>3</sub> conc.												
boll.	277.25	821.83	543.07	±	59.18	37	=	=	=	=	=	=
-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	200.46	545.09	361.09	±	34.08	32	=	=	=	=	=	=
-Acet. Na												
pH 4.8	7.38	39.57	14.80	±	2.43	57	=	=	=	=	=	=
P organ.(3)	50.06	283.15	124.00	±	18.57	52	=	=	=	=	=	=
P totale(4)	282.04	1104.04	655.52	±	81.34	43	=	=	=	=	=	=

(1) probabilmente già idrolizzati;

(2) acqua interstiziale dei sedi  
menti;

(3) met. Saunders e Williams;

(4) met. Collier



(3) met. Saunders e Williams;

(4) met. Collier

TABELLA 3 - Canali di bonifica (idrovore). Fosforo inorganico in soluzione (dati espressi in ppm)

		min	max	M	±	E	C <sub>v</sub>
Acqua interstiziale nei sedimenti	P	0.218	13.638	3.129	±	1.195	132
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.668	41.811	9.593	±	3.662	132
Strato d'acqua superficiale sopra i sedimenti	P	0.044	2.728	0.542	±	0.232	148
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.160	8.373	1.662	±	0.711	148

TABELLA 4 - Fiume Stella. Forme di azoto nei sedimenti e negli strati d'acqua a contatto coi sedimenti (dati espressi in ppm)

	sedimenti					acque					
	min	max	M	$\pm$ E	$C_v$	min	max	M	$\pm$ E	$C_v$	
N - NH <sub>4</sub>	idros.	2.24	5.18	3.69	$\pm$ 0.33	27	2.24	5.18	3.69	$\pm$ 0.33	27
	adsorb.	38.31	137.63	85.90	$\pm$ 10.45	36	=	=	=	=	=
	fissato	69.51	274.24	132.60	$\pm$ 19.56	42	=	=	=	=	=
	totale	110.06	415.79	227.99	$\pm$ 29.41	38	2.24	5.18	3.69	$\pm$ 0.33	27
N - NO <sub>2</sub>	0.02	0.08	0.04	$\pm$ 0.005	40	0.001	0.084	0.013	$\pm$ 0.009	209	
N - NO <sub>3</sub>	2.44	8.19	4.57	$\pm$ 0.68	44	0.022	1.626	0.286	$\pm$ 0.182	190	
N - inorg. totale	114.58	420.54	232.61	$\pm$ 29.30	38	2.35	5.23	3.98	$\pm$ 0.30	23	
N - org.	1985.42	8529.46	3739.60	$\pm$ 648.06	52	0.28	2.10	1.11	$\pm$ 0.21	58	
N - totale	2100.00	8950.00	3972.22	$\pm$ 671.50	50	4.03	6.19	5.09	$\pm$ 0.27	16	

TABELLA 5 - Fiume Stella. Forme di fosforo nei sedimenti e negli strati d'acqua a contatto coi sedimenti (dati espressi in ppm)

	sedimenti				acque				
	min	max	M ± E	C <sub>v</sub>	min	max	M ± E	C <sub>v</sub>	
P in soluz.	totale	=	=	=	=	0.085	3.801	1.540 ± 0.377	73
	organico	=	=	=	=	0.001	0.307	0.037 ± 0.033	272
	inorg.:								
	-ortof.	=	=	=	=	0.074	3.797	1.503 ± 0.378	75
	-polif.	(2)	(2)	(2)	=	praticam.		assenti (1)	
-totale	1.96	6.98	3.91 ± 0.62	47	0.074	3.797	1.503 ± 0.378	75	
P inorg. tot.	380.67	3106.83	845.50 ± 285.88	101	=	=	=	=	
P solub. in:									
-HNO <sub>3</sub> conc.									
boll.	535.73	3723.76	1023.84 ± 339.90	99	=	=	=	=	
-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	262.25	2534.02	546.49 ± 248.85	136	=	=	=	=	
-Acet. Na									
pH 4.8	11.83	110.71	27.05 ± 10.52	116	=	=	=	=	
P organ. (3)	65.54	1096.58	307.52 ± 103.32	100	=	=	=	=	
P totale (4)	634.51	4203.41	1147.36 ± 383.60	100	=	=	=	=	

(1) probabilmente già idrolizzati;

(2) acqua interstiziale dei sedimenti;

(3) met. Saunders e Williams;

(4) met. Collier

TABELLA 6 - Fiume Stella. Fosforo inorganico in soluzione  
(dati espressi in ppm)

		min	max	M ± E	C <sub>v</sub>
Acqua pura di risorgiva senza sedimenti	P	0.000	0.009	0.005 ± 0.000	0
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.000	0.029	0.015 ± 0.000	0
Acqua interstiziale nei sedimenti	P	1.966	6.982	3.911 ± 0.618	47
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	6.027	21.405	11.990 ± 1.895	47
Strato d'acqua a contatto dei sedimenti	P	0.074	3.797	1.503 ± 0.378	75
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.227	11.641	4.607 ± 1.160	75
Strato d'acqua superficiale sopra i sedimenti	P	0.049	0.114	0.074 ± 0.008	27
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.150	0.349	0.227 ± 0.024	27

TABELLA 7 - Canali di bonifica (idrovore) e fiume Stella.

Carbonio organico e forme di zolfo nei sedimenti e negli strati d'acqua a contatto coi sedimenti (dati espressi in ‰)

	sedimenti				acque			
	min	max	M ± E	C <sub>v</sub>	min	max	M ± E	C <sub>v</sub>
C a n a l i   d i   b o n i f i c a								
S totale	3.41	40.72	9.97 ± 2.92	101	=	=	=	=
S - SO <sub>4</sub>	0.66	6.13	2.17 ± 0.41	65	0.011	0.479	0.140 ± 0.045	112
S altre forme	1.84	34.59	7.81 ± 2.55	113	=	=	=	=
C organico	23.83	66.95	40.59 ± 3.83	32	0.044	0.156	0.067 ± 0.010	54
F i u m e   S t e l l a								
S totale	2.84	5.92	4.28 ± 0.32	22	=	=	=	=
S - SO <sub>4</sub>	1.12	3.73	2.19 ± 0.31	42	0.008	0.035	0.017 ± 0.000	0
S altre forme	0.38	3.65	2.06 ± 0.36	53	=	=	=	=
C organico	23.92	89.82	57.49 ± 6.39	33	0.011	0.071	0.033 ± 0.005	42

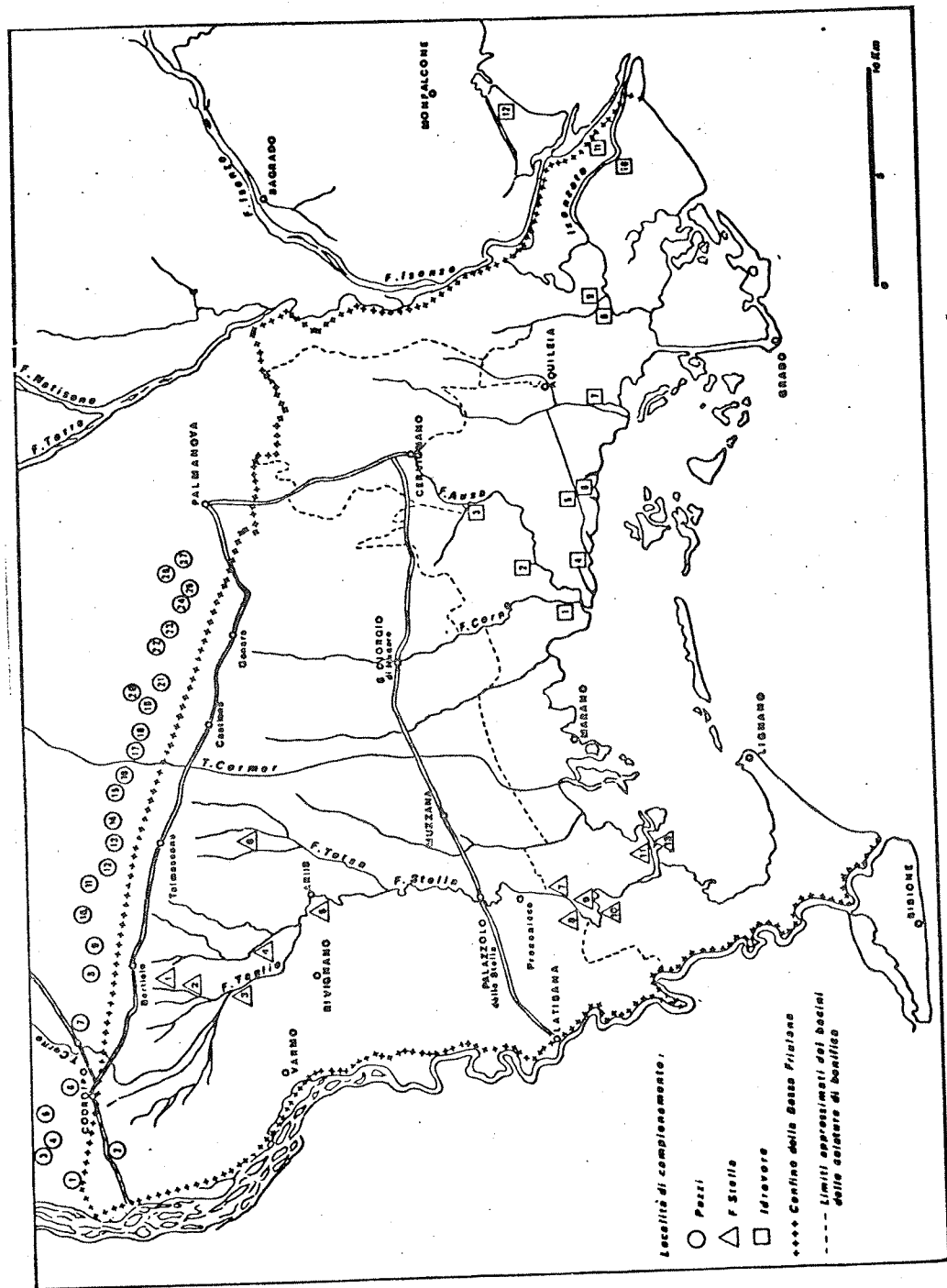


Fig. 1 - Zona della pianura oggetto delle ricerche

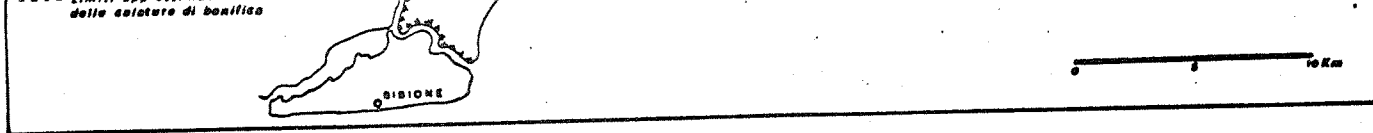


Fig. 1 - Zona della pianura oggetto delle ricerche

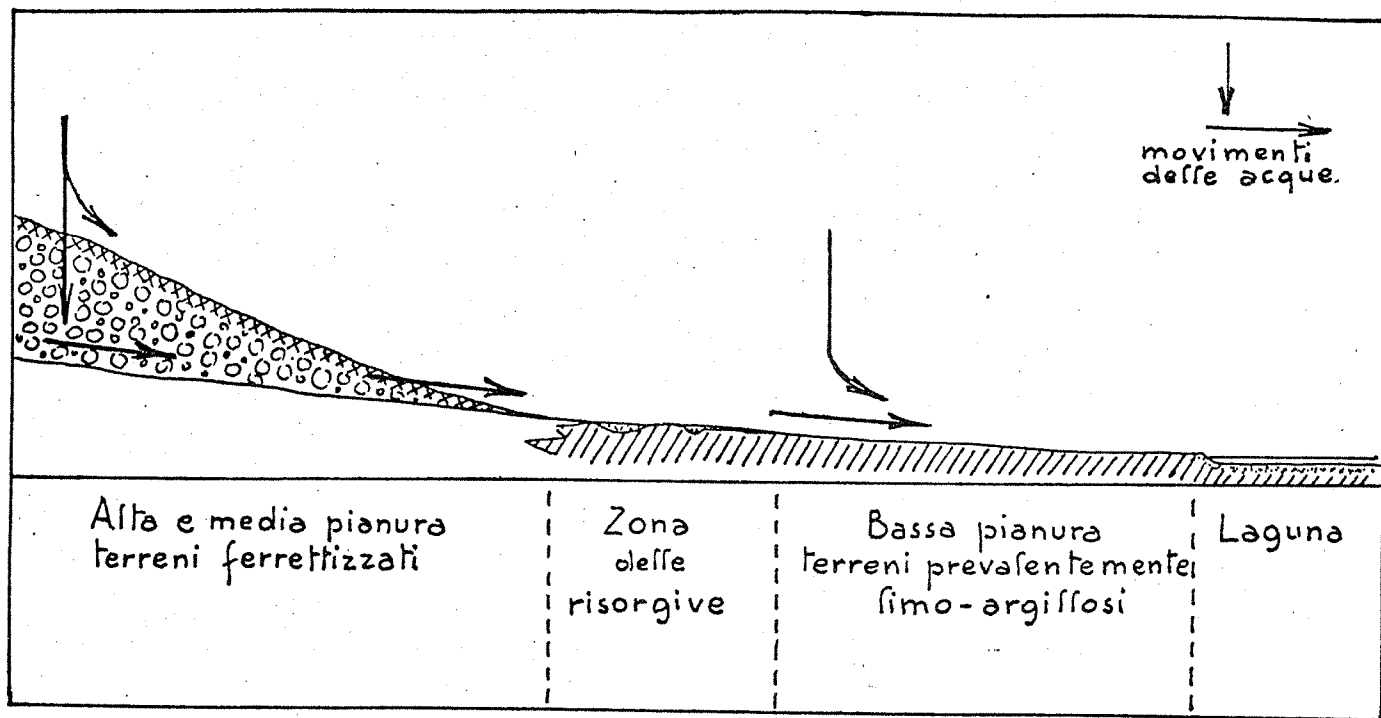


Fig. 2 - Sezione N-S schematica della pianura del Friuli Centrale

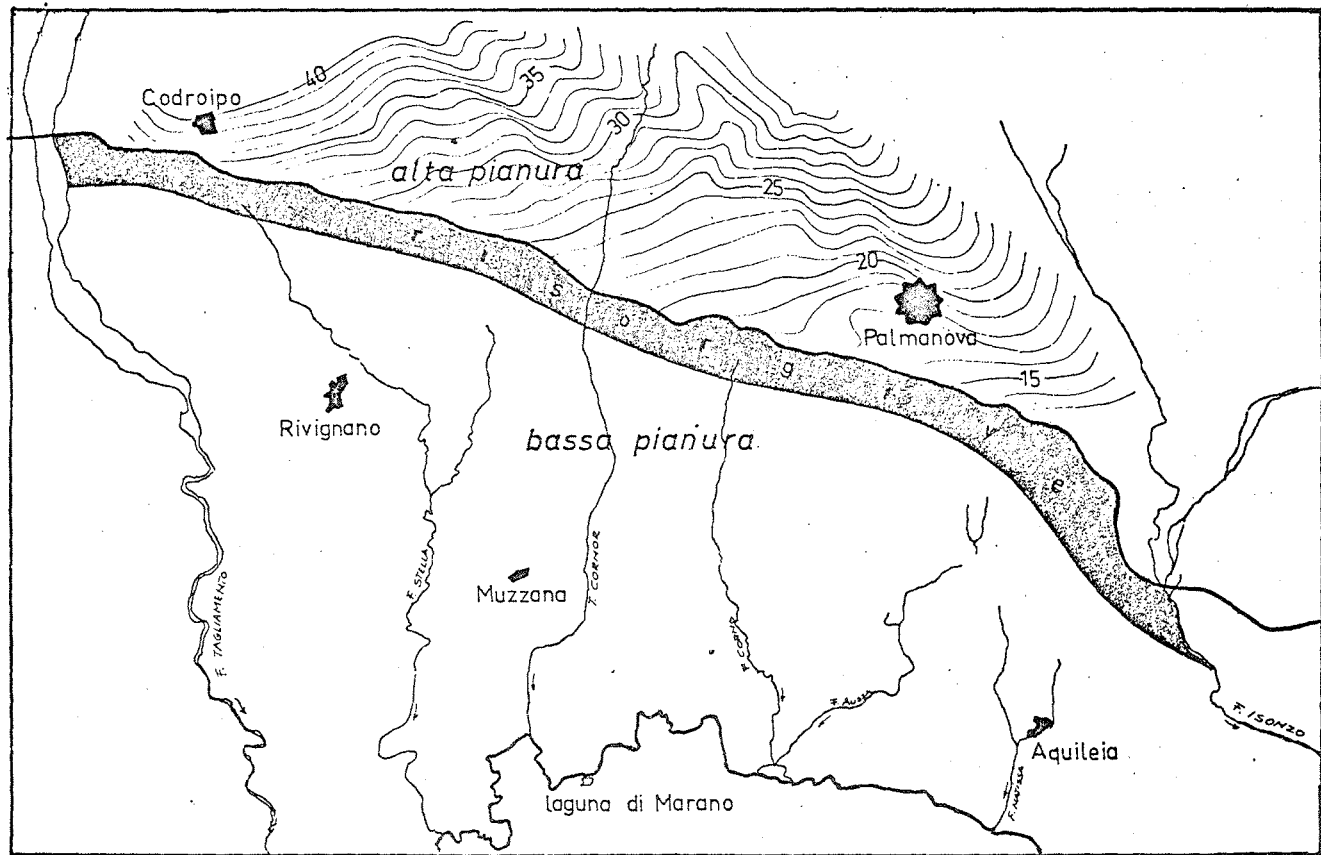


Fig. 3 - Planimetria schematica della pianura del Friuli Centrale  
(da Broili, 1973)





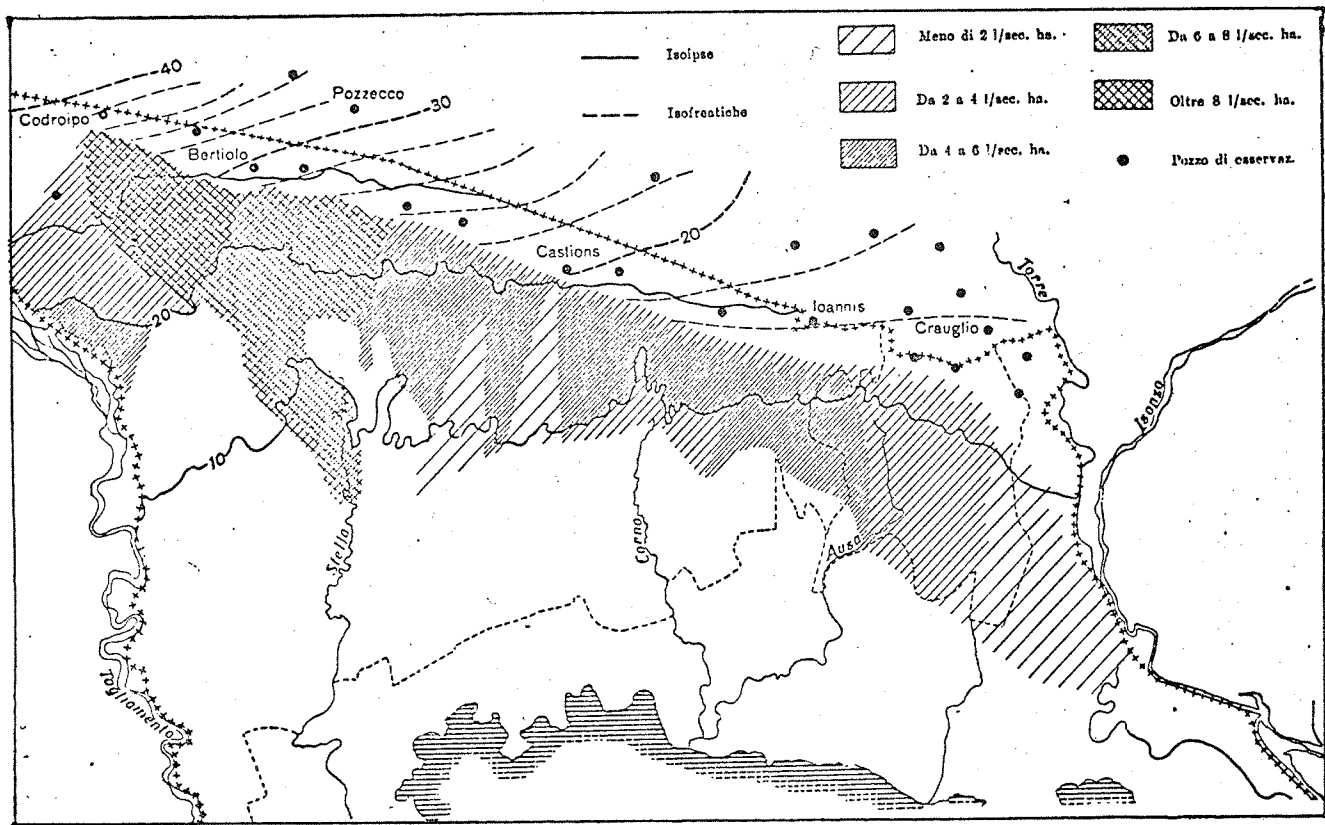


Fig. 5 - Distribuzione delle portate affioranti sulla superficie della zona di risorgenza (da De Marchi, 1931)

## ULTERIORI RICERCHE SULLA DEGRADAZIONE MICROBICA DEGLI ALCHILBENZENSOLFONATI

Baggi G., Catelani D., Colombi A. e Galli E.

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università di Milano

In questi ultimi anni il metabolismo dei fenilalcani ha assunto maggior interesse in quanto strettamente legato alla degradazione di alcuni erbicidi e dei tensioattivi anionici tipo LAS costituiti da alchilbenzensolfonati.

Webley et al. (1956) hanno dimostrato che la degradazione degli 1-fenilalcani a lunga catena alifatica inizia con l'ossidazione del metile terminale a carbossile e successiva  $\beta$ -ossidazione della catena laterale. Più recentemente Sariaslani et al. (1974) hanno osservato per l'1-fenildodecano l'intervento anche di un meccanismo di  $\alpha$ -ossidazione concomitante a quello  $\beta$ -ossidativo. Nel nostro Istituto è stata invece studiata la degradazione microbica di fenilalcani diversi per la lunghezza della catena e per la posizione del fenile sulla catena stessa. Dalle ricerche sinora effettuate (Baggi et al., 1972) sembra che lo schema degradativo di questi composti sia influenzato non tanto dalla posizione del fenile sulla catena alchilica quanto dalla lunghezza della catena stessa; l'attacco microbico infatti del 2-fenilbutano, 3-fenilpentano e 4-fenileptano inizia dall'anello aromatico con formazione di un diolo e successivamente di un composto correlabile con la semialdeide ossimuconica, mentre quello dell'1-, 2- e 3-fenildodecano inizia dalla catena laterale con la formazione intermedia di acidi grassi fenilsostituiti. A conferma di questi risultati è da rilevare che le specie microbiche capaci di degradare l'1-, 2- e 3-fenildodecano non sono capaci di utilizzare il 2-fenilbutano, il 3-fenilpentano e il 4-fenileptano. Analogamente i microrganismi capaci di crescere su questi ultimi fenilalcani non utiliz-

zano quelli a catena più lunga.

Per quanto riguarda la degradazione degli alchilbenzensolfonati con il fenile in C-1, gli studi sinora effettuati da diversi AA. hanno dimostrato l'esistenza delle seguenti vie metaboliche, così riassunte da Cain et al. (1972):

- 1)  $\omega$  - e  $\beta$ -ossidazione della catena alifatica senza distacco del gruppo solfonico nè degradazione dell'anello aromatico.
- 2) Distacco idrolitico o riduttivo del gruppo solfonico accompagnato da  $\omega$  - e  $\beta$ -ossidazione della catena laterale e successiva apertura intra-diolo dell'anello aromatico.
- 3) Distacco idrolitico o riduttivo del gruppo solfonico accompagnato dalla degradazione dell'anello aromatico, senza demolizione del gruppo alchilico ad esso legato.

Mentre i primi due meccanismi sono caratteristici degli 1-fenilalcani-p-solfonati a lunga catena, il terzo meccanismo è stato riscontrato solo per il p-toluensolfonato.

Nessun lavoro era stato sin qui condotto sulla degradazione di alchilbenzensolfonati recanti il solfofenile in posizione diversa da C-1 con microrganismi isolati in coltura pura. Solo Swisher (1972) lavorando con colture miste ha dimostrato per alcuni composti di questo tipo l'esistenza di un meccanismo di  $\beta$ -ossidazione della catena laterale seguito da desolfonazione e degradazione del nucleo aromatico.

In questa comunicazione riferiamo sulle ricerche relative alla degradazione di alcuni alchilbenzensolfonati di sintesi, recanti il sostituito solfofenile in diverse posizioni della catena alchilica. Sino ad ora abbiamo studiato il metabolismo del 2- e 3-fenildodecano-p-solfonato da parte di uno Pseudomonas isolato dal Dr. Cardini della Società Italiana Resine (Milano). Tale microrganismo si è dimostrato in grado di utilizzare per la crescita il 2- e 3-fenildodecano-p-solfonato quando forniti a concen-

trazioni non superiori a 20 mg/l come unica fonte di C ed energia. Allo scopo di ottenere una crescita valutabile turbidimetricamente e di accumulare nelle colture quantità di metaboliti sufficienti alla loro identificazione, si è quindi reso necessario procedere ad aggiunte successive nelle colture di pari quantità di substrato seguendone la degradazione tramite il test al blu di metilene (Longwell e Maniece, 1965) e mediante spettrofotometria nell'u.v. (lettura a 225 nm secondo Swisher (1972)). Le prove eseguite hanno dimostrato che il microrganismo isolato è in grado di degradare solo parzialmente la catena laterale, non di desolfonare nè di degradare il nucleo aromatico: nella colture si è osservato infatti l'accumulo di metaboliti recanti intatto l'anello benzenico solfonato. Una conferma di questo risultato è data dal mancato riscontro di solfiti e solfati nel mezzo colturale. I prodotti metabolici sono stati estratti dalle colture come descritto da Willetts e Cain (1972), quindi desolfonati chimicamente con acido fosforico secondo il metodo di Setzkorn e Carel (1963), modificato da Catelani e Vandoni (1974): si è ottenuto in tal modo un residuo che è stato analizzato alla gascromatografia-spettrometria di massa. Nelle colture con 2-fenildodecano-p-solfonato è stato riconosciuto il 3-oxo-1-metilindano (prodotto di ciclodisidratazione dell'acido 3-fenilbutirrico), mentre in quelle con 3-fenildodecano-p-solfonato sono stati riconosciuti la 4-oxo-1-etiltetralina (prodotto di ciclodisidratazione dell'acido 4-fenilesanoico) e il 3-oxo-1-etilindano (prodotto di ciclodisidratazione dell'acido 3-fenilpentanoico).

Per quanto riguarda la degradazione dei fenilalcani con il gruppo fenilico in posizione centrale della catena alchilica, siamo riusciti ad ottenere soltanto delle colture di arricchimento in presenza di 5-fenilnonano, 6-fenilundecano e 7-feniltetradecano, colture che sono state mantenute in vita per successivi trapianti per più

di due anni. Sono tuttora in corso ricerche per individuare i processi biochimici e microbiologici connessi con la degradazione di tali composti e per definire il meccanismo di degradazione delle catene laterali del 2- e 3-fenildodecano-p-solfonato.

#### BIBLIOGRAFIA

- Baggi G., Catelani D., Galli E. & Treccani V. (1972) *Biochem. J.* 126, 1091
- Cain R.B., Willetts A.J. & Bird J.A. (1972) in *Biodeterioration of Materials* (Walters A.H. & Hueck-van der Plas E.H. eds.) p.136, Applied Science Publishers Ltd, London
- Catelani D., Vandoni M.V. (1974) *Riv.Ital.Sost.Grasse* 51, 13
- Longwell J., Maniece W.D. (1965) *Analyst* 80, 167
- Sariaslani F.S., Harper D.B. & Higgins I.J. (1974) *Biochem. J.* 140, 31
- Setzkorn E.A., Carel A.B. (1963) *J.Am.Oil Chem.Soc.* 40, 57
- Swisher R.D. (1972) *Yukagaku* 21, 130
- Webley D.M., Duff R.B. & Farmer V.C. (1956) *Nature (London)* 178, 1467
- Willetts A.J., Cain R.B. (1972) *Biochem. J.* 129, 389

SULLA DEGRADAZIONE MICROBICA DI ALCUNI TENSIO-  
ATTIVI NON IONICI

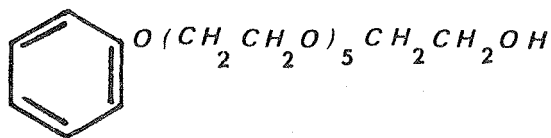
Baggi G., Galli E., Scolastico C. e Treccani V.  
Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università  
di Milano; Istituto di Chimica Organica, Facoltà di Scienze,  
Università di Milano

Recentemente, nell'ambito delle ricerche sui tensioattivi che si stanno da tempo conducendo nel nostro Istituto, si è iniziato lo studio della degradazione dei tensioattivi non ionici che, come è noto, sono ottenuti industrialmente per condensazione di ossido di etilene con alcoli, fenoli, acidi carbossilici ecc.. Le attuali conoscenze sui meccanismi biochimici che presiedono alla degradazione di questa classe di tensioattivi sono molto scarse e derivano <sup>da</sup> esperienze condotte con colture miste di microrganismi e con prodotti industriali. E' noto tuttavia che alcuni sono facilmente mineralizzabili (alcoli ed acidi etossilati) mentre gli alchilfenoli etossilati sembrano subire solo una parziale degradazione (Schick, 1967).

Le nostre ricerche sono state impostate al fine di studiare la degradazione delle catene etossiliche sia come tali che legate al gruppo fenilico. A tale scopo sono stati isolati, da colture di arricchimento appositamente allestite, microrganismi capaci di crescere su differenti glicoli (dal glicol monoetilenico al poliglicol 4000 costituito da 70-90 gruppi etossilici) forniti come unica fonte di C e di energia. Le prove di crescita hanno dimostrato che i microrganismi capaci di utilizzare i poliglicoli non sono in grado di crescere in presenza degli omologhi inferiori della serie; nella stessa misura i microrganismi capaci di crescere sui glicoli a basso peso molecolare non utilizzano quelli ad alto peso molecolare. Tale comportamento è analogo a quello osservato per la maggior parte dei microrganismi capaci di degradare gli al-

cani.

Una delle forme microbiche isolate capace di crescere in presenza di poliglicol 4000 si è dimostrata anche in grado di utilizzare l'esaetilenglicolmonofenilettere. Tale composto è stato scelto come modello per studiare la degradazione delle catene etossiliche legate ad un anello aromatico. Infatti i tensioattivi della classe degli alchilfenoli etossilati, come è noto, sono costituiti da poliglicolimonofeniletteri sostituiti, per lo più in posizione para, con una catena alchilica ramificata a 9 atomi di C che impedisce la loro completa mineralizzazione.



*esaetilenglicolmonofenilettere*

L'esaetilenglicolmonofenilettere è stato sintetizzato a partire dall'esaetilenglicol puro utilizzando la protezione di uno dei due OH come tetraidropiranyl etere e la attivazione dell'altro come metansolfonato, nella reazione di condensazione con fenato di potassio (Cornforth et al., 1973). Il prodotto ottenuto dopo idrolisi e purificazione cromatografica su colonna di silice è risultato gascromatograficamente puro sia come tale che come acetato se esaminato su colonna di vetro di 1 m di lunghezza, usando come riempimento SE 30 (2,5%) su Chromosorb W silanizzato 80-100 mesh.

Allo scopo di studiare lo schema degradativo di questo composto sono state allestite colture in terreno esclusivamente minerale (Raymond & Davis, 1960) in cui il



composto saggiato veniva aggiunto alla concentrazione del 0,05%. A diversi tempi di incubazione le colture venivano estratte ripetute volte con cloroformio a pH 7. L'estratto organico, dopo disidratazione con solfato sodico anidro ed evaporazione a secco sotto vuoto, veniva gascromatografato in programmata da 80°C a 250°C ( con un incremento di 6°C ogni minuto primo). Gli unici metaboliti che comparivano nella fase neutra mostravano tempi di ritenzione inferiori a quello del composto di partenza ed alla gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, utilizzando un potenziale di ionizzazione di 16 eV, mostravano uno ione molecolare ed una frammentazione in accordo con la struttura di omologhi inferiori dell'esaetilenglicolmonofenilettere.

TABELLA 1 - Percentuali relative di  $C_6H_5-O-(CH_2CH_2O)_nH$  per n=1,2,3,4,5,6 gruppi etossilici a diversi tempi di incubazione.

	n=6	n=5	n=4	n=3	n=2	n=1
4h	94	6	-	-	-	-
8h	42,5	35	19	2	1	0,5
14h	7	8	23	12	47,5	2,5
24h	-	-	-	-	36	64
48h	-	-	-	-	34	66
72h	-	-	-	-	37	63

I risultati ottenuti dimostrano che si ha il distacco di una formale unità di glicol etilenico per volta a partire da quella terminale e che il microrganismo non è capace di degradare il nucleo aromatico.

Al fine di individuare il meccanismo coinvolto nella degradazione della catena etossilica, si sono eseguite alcune prove manometriche di induzione sequenziale che hanno dimostrato come le cellule non proliferanti cresciute su poliglicol 4000 sono simultaneamente indotte ad ossidare l'esaetilenglicolmonofenilettere, l'aldeide glico-

lica, l'acido glicolico, non il glicol etilenico.

Tale risultato, unitamente al fatto che il microrganismo non è capace di utilizzare per la crescita il glicol etilenico, farebbe escludere la diretta formazione per idrolisi di questo composto. Sono in corso ulteriori indagini per chiarire il meccanismo biochimico implicato nella degradazione della catena etossilica.

#### BIBLIOGRAFIA

Cornforth J.W., Morgan E.D., Potts K.T. & Rees R.J.W.

(1973) *Tetrahedron*. 29, 1659

Raymond R.L., Davis J.B. (1960) *Appl. Microbiol.* 8, 329

Schick M.J. (1967) in Nonionic Surfactants (Schick M.J. ed.) vol.1, p.971, Marcel Dekker Inc., New York

RIFLESSI IGIENICI DELLA CONTAMINAZIONE DEL SUOLO DA PARTE DI DETERGENTI SINTETICI E DI UN ERBICIDA

L. Annicchiarico Sebastiani, G. Tarsitani, A. D'Arca Simonetti

Istituto di Igiene "G. Sanarelli" dell'Università di Roma  
Laboratorio di Radiobiochimica ed Ecofisiologia Vegetali  
del C.N.R. Roma

Il suolo, questo grande recipiente naturale ove si perpetua il ciclo della materia vivente, accoglie e dà vita ad una miriade di microrganismi saprofiti che appunto di tale ciclo sono anelli fondamentali.

La salvaguardia di questo micromondo da possibili insulti che ad esso possono pervenire per lo sversamento dei più vari contaminanti derivanti dall'attività dell'uomo e per l'uomo è impegno preciso di quanti, responsabilmente, sentono questo problema ed è stato altresì motivo propulsore di una notevole messe di studi che si sono andati moltiplicando in questi ultimi anni. (Goldberg Federico et al. 1965, 1966, 1967, 1969; Goldberg Federico, 1971; Gorieri Scalaffa et al. 1966; Vandoni, 1968; Vandoni et al. 1969, 1972; Balicka et al. 1969; Sobieszczanski, 1969; Cenci, et al. 1972, 1973;) e di cui autorevolmente si è parlato, anche nell'attuale Convegno.

Noi, anche come igienisti, siamo parimenti interessati al tema: salvaguardia dell'ambiente visto, finalisticamente, nei riflessi che esso può avere sulla salute e sul benessere del singolo individuo e, soprattutto, delle collettività umane. Da vari anni pertanto stiamo svolgendo ricerche sulla contaminazione del suolo da parte di sostanze ad esso estranee ed in esso pervenute o direttamente per applicazione di contaminanti vari, oppure indirettamente con le acque di irrigazione e non. I contaminanti del terreno possono essere distinti in due grandi categorie: biodegradabili e non biodegradabili. Nel primo caso essi vengono riguardati con minor sospetto perchè permangono nell'ambiente per tempi più o meno brevi. Va peraltro ricordato che tale degradazione comporta sempre una modificazione della facies microbiologica naturale poichè ne deriva un potenziamento della flora atta a compiere tale de

gradazione ed un depauperamento di quella flora che detta mineralizzazione non è in grado di effettuare. Ne può derivare altresì, dati i vari livelli di biodegradazione, una contaminazione secondaria da parte di prodotti intermedi che, non reinserendosi nei cicli naturali, conserva ancora la fisionomia di veri e propri contaminanti. Nel secondo caso, quando trattasi di contaminanti non degradabili, il pericolo del loro ritorno all'uomo per le vie più varie, prima fra tutte quella alimentare, è intuitivo e ben noto.

Al suolo possono del pari pervenire da numerose vie (acque superficiali, liquami ecc.), microrganismi non saprofiti. Questi, pur trovandosi in un ambiente disgenico, a seconda delle condizioni ambientali che incontrano permangono in esso per tempi più o meno lunghi: tali microrganismi inoltre, sia microbi sia virus, veicolati per la massima parte dall'acqua o anche da soluzioni di contaminanti possono raggiungere strati relativamente profondi e determinare una contaminazione della falde acquifere non protette.

Particolarmente interessante è dunque l'influenza che la contaminazione dell'ambiente suolo può avere sia per i suoi riflessi su uno dei problemi fondamentali di ecologia (turbamento dell'equilibrio biologico del suolo) come pure sul problema igienico di tutela della salute (inquinamento degli alimenti ed in particolare delle acque).

Allo scopo di studiare questo secondo aspetto del problema abbiamo intrapreso una serie di indagini sia chimiche sia microbiologiche, tendenti a rilevare il comportamento di contaminanti diversi nell'ambiente terreno, e più precisamente: la loro maggiore o minore capacità di penetrazione ed la loro incidenza sul movimento e la vitalità dello stafilococco albo, assunto quale germe test di una flora microbica non saprofitica e presente occasionalmente nel terreno, e ciò al fine di valutare il loro ruolo nella possibile contaminazione microbica della falde idriche. I contaminanti da noi studiati sono stati i detergenti sia non degradabili (hard) che biodegradabili (soft) ed un erbicida del gruppo delle triazine sostituite: la prometrina o 2 metiltio 4-6 bis isopropilamine s-triazina. Questi contaminanti sono stati fatti percolare attraverso colonne (cm. 6 x cm. 150 con punti di prelievo laterale)

contenenti successivamente: sabbia, miscela sabbia argilla e terreno naturale agrario, e ciò per valutare la diversa capacità di penetrazione a seconda della natura del terreno. Le prove si sono svolte a temperatura ambiente

Per ogni substrato studiato sono state condotte 3 serie di prove:

- a) Prove di adsorbimento dei contaminanti su diversi substrati (concentrazione contaminanti 18 mg/l)
- b) Prove di movimento dei contaminanti attraverso colonne
- c) Prove di movimento del microrganismo test attraverso colonne, in presenza o no dei contaminanti.

A) Le prove di adsorbimento dei tre contaminanti allo studio hanno dato valori, come prevedibile, massimi per il terreno naturale e minimi per la sabbia, pur con andamenti caratteristici a seconda delle sostanze saggiate (grafico 1). Per sinteticità di esposizione ci limitiamo a riportare, nella tabella sottostante i valori medi (rapporto tra concentrazione adsorbita e concentrazione iniziale) ottenuti nel corso delle varie sperimentazioni.

	hard detergent	soft detergent	prometrina
sabbia	13-14%	30-32%	15-16%
sabbia argilla	26-27%		20%
terreno naturale	60-70%		20-30%

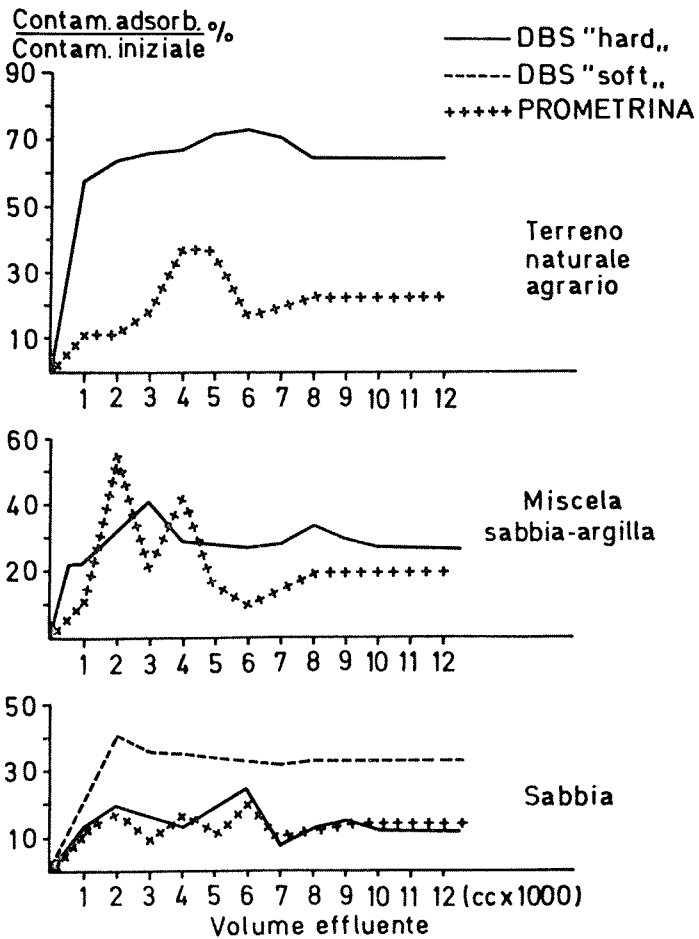
B) Le prove di movimento dei contaminanti sono state condotte avvalendosi di colonne di vetro ripiene del terreno in esame e saturate con acqua fontis.

I risultati ottenuti, espressi nel grafico 2 relativo ai punti di prelievo più distali, possono riassumersi nella maniera seguente: per quanto concerne il movimento del detergente non degradabile questo è avvenuto con velocità via via decrescente man mano che si è passati dalle colonne con sola sabbia a quelle con miscela sabbia-argilla ed a quelle infine con terreno naturale. Il recupero del tensioattivo determinato con la metodica proposta degli Standard Methods for the Examination of Water and WasteWater è avvenuto peraltro in quantità molto rilevante dal 70 al 90% in tutti e tre i substrati studiati anche a livello dell'ultimo punto di prelievo.

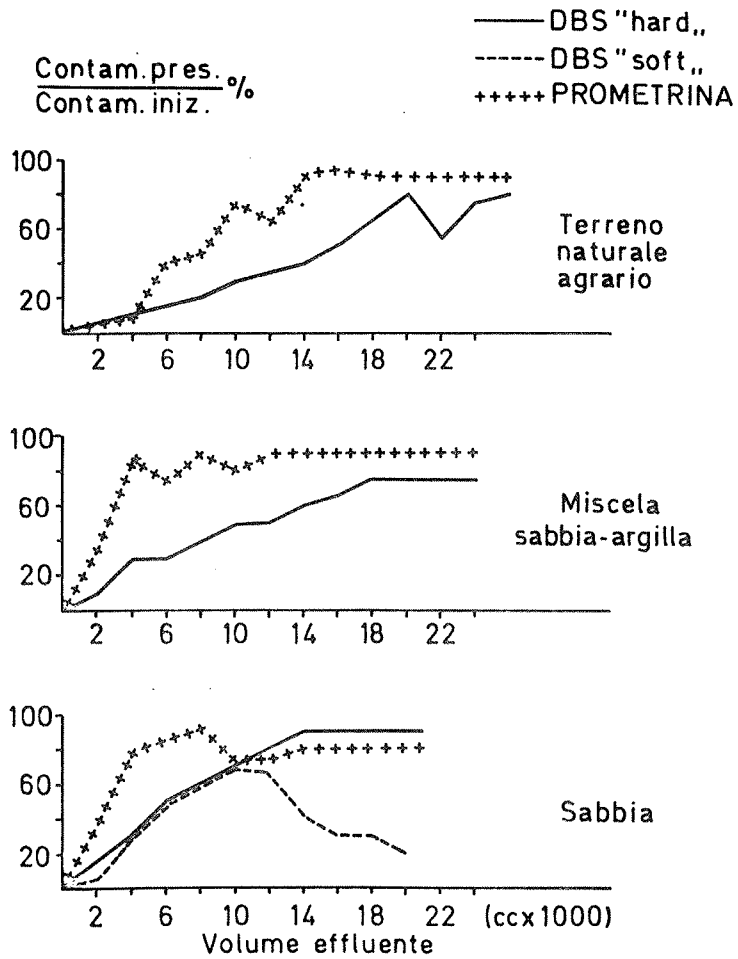
Il movimento del detergente biodegradabile con il sub-

Graf.1

### ADSORBIMENTO DEI CONTAMINANTI NEI VARI TERRENI



Graf.2  
MOVIMENTO DEI CONTAMINANTI NEI TERRENI  
(a cm 120 di profondità)



strato sabbia, si è presentato in un primo tempo molto simile a quello del detergente non degradabile, infatti si è avuto un recupero di circa il 70% al punto più distale di prelievo. In un secondo momento però, dopo circa 9-10 litri di liquido percolante, la concentrazione del detergente biodegradabile comincia a mostrare una contrazione fino a ridursi in corrispondenza di 18-20 litri a valori estremamente bassi. Ciò è da attribuirsi con buona presunzione alla degradazione sia da parte dello stafilococco sia da parte di altri eventuali microrganismi di sorta insediati nel substrato allo studio, inizialmente sterile.

Per quanto concerne infine il movimento della prometrina, attraverso colonne contenenti i diversi terreni, esso ha ripetuto l'andamento messo in evidenza dal detergente non degradabile mostrando un reperimento pressochè totale in concentrazioni oscillanti tra il 75-90% in tutti e tre i terreni sperimentati ed alle profondità maggiori da noi considerate (90-120 cm dalla superficie del terreno.) Non ci è possibile precisare se a queste profondità sia stata messa in evidenza la sola prometrina non degradata ovvero anche i primi prodotti di degradazione. Infatti la metodica di determinazione da noi seguita (idrolisi a caldo con acido solforico e determinazione spettrofotometrica all'ultravioletto del derivato idrolizzato della prometrina) non permette di differenziare la prometrina dai suoi derivati idrolizzati.

Alla luce dei dati acquisiti dalla letteratura c'è la possibilità di degradazione della prometrina sia ad opera di microrganismi (Bryant 1963, Mickovski et al. 1967; Murray et al. 1968; Kaufman 1969) sia, con maggiore difficoltà ed in archi di tempo molto ampi, spontaneamente nel terreno quando il pH raggiunge valori molto bassi (Weber 1970, Ercegovich 1965). La biodegradazione secondo Mueller e Payot, 1966; avverrebbe prima come una ossidazione a solfone ed a solfossido e successivamente con idrolisi e formazione di idrossipropazina.

C) Le prove riguardanti l'influenza dei contaminanti in esame sulla capacità di approfondimento di un microrganismo test (stafilococco albo di collezione) sono state precedute da prove preliminari che hanno dimostrato la non tossicità alla concentrazione di prova, per lo stafilococ



co, di detti contaminanti, sono state condotte inoculando tale microrganismo (4 agar patine di 72 h. riprese con acqua distillata, per ciascuna colonna) direttamente nel battente libero, dopo saturazione delle colonne riempite di sabbia. La percolazione del contaminante è stata protratta fino alla completa scomparsa dello stafilococco nell'effluente. I risultati sono stati valutati comparativamente a quelli delle colonne controllo in cui, nelle medesime condizioni sperimentali, veniva fatta veicolare aqua fontis.

La sperimentazione è stata condotta, come detto usando quale substrato la sabbia, riteniamo peraltro che i risultati ottenuti, siano estrapolabili anche ai terreni di altra natura purchè non arrivino a concentrazione elevate di argilla (80%). Nel grafico 3 sono espressi i valori medi delle cariche microbiche rilevate nei punti più distanti nelle diverse prove compiute.

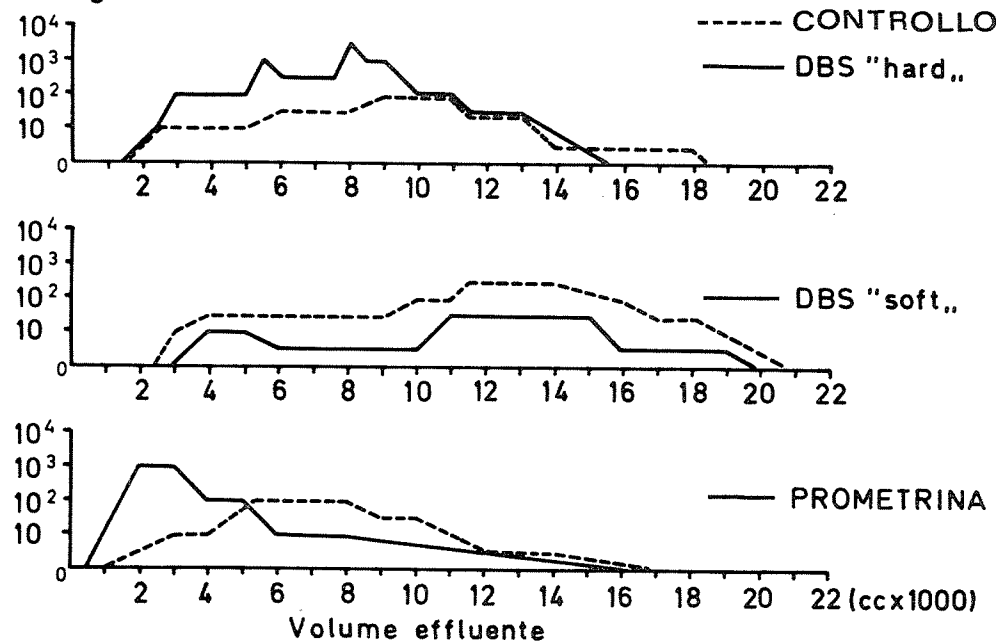
Nel suddetto grafico, la stafilococco albo mostra di risentire sensibilmente, ai fini di un più rapido approfondimento negli strati inferiori di sabbia, della presenza o meno di detergente non degradabile, questo incide sia sul tempo impiegato dai microrganismi per raggiungere gli strati profondi, riducendolo, sia sulla quantità di microrganismi che vi pervengono aumentandola.

Diverso è stato invece il comportamento dello stafilococco quando il liquido percolante è stato il detergente biodegradabile. In questo caso il numero di microrganismi evidenziati negli strati più bassi della colonna, ove la degradazione è più accentuata, è stato sempre piuttosto scarso e comunque sempre inferiore al numero di microrganismi veicolati dall'acqua nella colonna controllo. Questo probabilmente è dovuto all'azione inibitrice sul microorganismo test da parte di microrganismi ambientali occasionalmente insediatisi nelle colonne di percolazione ed esaltati dalla presenza bioattiva del contaminante.

Per quanto concerne la fuoriuscita dello stafilococco con la prometrina si rileva che l'erbicida, sia come molecola integra, sia associato eventualmente ai primi prodotti di degradazione, agevola sensibilmente il movimento del germe test (rispetto alle colonne di controllo percolate da sola acqua). Detto microrganismo infatti è stato evidenziato alle massime profondità studiate dopo percola

Graf.3

MOVIMENTO DELLO STAFILOCOCCO ALBO A 120 cm DI PROFONDITA'  
microorganismi/cc



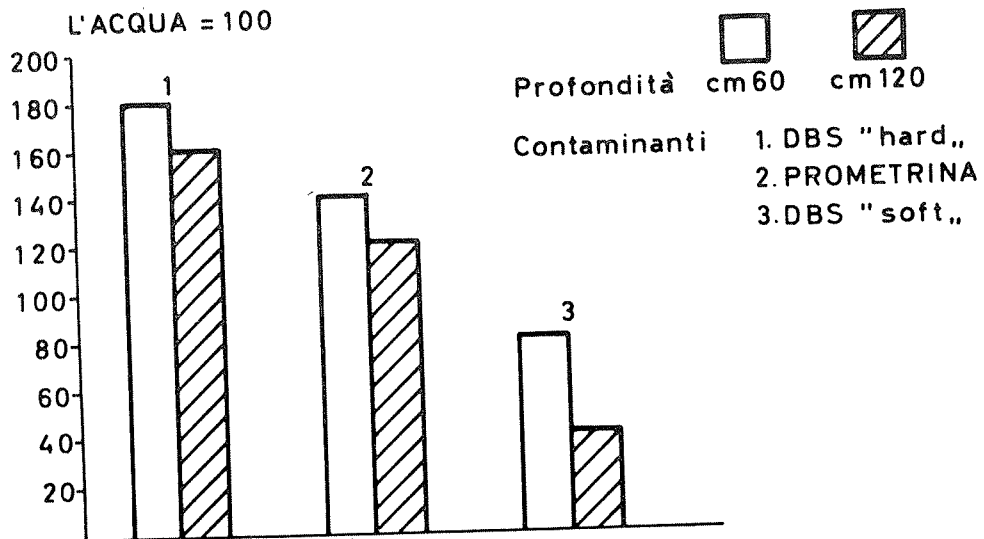
zione di quantitativi anche esigui della soluzione.

Al fine di sintetizzare i risultati ottenuti, nel graf. 4 si è stabilita uguale a 100 la fuoriuscita dello stafilococco nelle colonne con percolazione di acqua, e si è valutata in proporzione, sia alla profondità di 120 cm. che a quella di 60 cm., la fuoriuscita del germe test con i diversi contaminanti studiati.

Si è dunque messa in evidenza con tutte queste prove la possibilità di inquinamento dell'ambiente suolo con rischio di turbamento del suo equilibrio biologico, di contaminazione della catena alimentare a causa dell'adsorbimento e della permanenza in esso dei contaminanti studiati, ed infine di inquinamento chimico e microbiologico di falde idriche non protette, è emerso infatti chiaramente dalla sperimentazione effettuata, che quando un flusso costante di una soluzione contaminante raggiunge il terreno, questa soluzione perviene in concentrazione pressochè uguale a quella iniziale negli strati inferiori del suolo, veicolando microrganismi anche non tipici a profondità inconsuete.

Graf. 4

PERCENTUALE DI FUORIUSCITA DELLO  
STAFILOCOCCO ALBO IN FUNZIONE DI  
DIVERSI CONTAMINANTI RISPETTO AL-  
L'ACQUA = 100



BIBLIOGRAFIA

- Balicka N., Sobieszczanski J. (1969) Act. Microbiol. Polon. 18, 3
- Balicka N., Sobieszczanski J. (1969) Act. Microbiol. Polon. 18, 7
- Balicka N. Sobieszczanski J. (1969) Act. Microbiol. Polon. 18, 11
- Bryant Y.B. Thesis, Pen. State Univ. 1963
- Cenci P., Cavazzini G. (1972) Igiene Mod. 65, 117
- Cenci P., Cavazzini G. (1972) Ig. Mod. 65, 477
- Cenci P., Cavazzini G. (1973) Ig. Mod. 66, 133
- Cenci P., Cavazzini G. (1973) Ig. Mod. 66, 271
- Ercegovich C.D.: dati non pubblicati, citato in Kearney P.C., Kaufman D.D. Dekker, New York, 1969 pag.61
- Kaufman D.D., Kearneu P.C. (1970) Residue Rev. 32, 237
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V. (1965) Chimica 41, 403
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V. (1966) Chimica 42, 293
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V., Garoia V. (1967) Chimica 43, 169
- Goldberg Federico L., Vandoni M.V., Garoia V. (1969) Nuov. Chim. 45, 78
- Gorieri Scalaffa P., Goldberg Federico L. (1966) Chimica 42, 136
- Mickovaki M., Verona O. (1967) Agr. Ital. 67, 67
- Murray D.S., Rieck W.L. (1968) Agron. Abstr. 60, 95

- Sobieszczanski J. (1969) Act. Microbiol. Polon. 18, 39
- Vandoni M.V. (1968) Chimica 44, 10
- Vandoni M.V., Goldberg Federico L. (1969) Nuov. Chim. 45  
86
- Vandoni M.V., Goldberg Federico L. (1972) Agricol. Ital.  
2, 103
- Weber J.B. (1970) Residue Rev. 32, 119

# EFFETTI DEI PRINCIPI ATTIVI DI ALCUNI DETERSIVI SULLA GERMINABILITA' E SULLA CRESCITA DI PIANTE ERBACEE

N. Rossi

Istituto di Chimica Agraria, Università di Bologna

## INTRODUZIONE

Un aspetto particolare dell'inquinamento delle acque superficiali è costituito dalla presenza dei principi attivi dei detersivi nelle acque di irrigazione.

Queste sostanze, avendo la capacità di abbassare la tensione superficiale dell'acqua anche a concentrazioni relativamente basse, possono produrre considerevoli cambiamenti sulle attività enzimatiche (Sirakov e Schulga, 1971) e sulle proprietà delle membrane cellulari (Endo et al., 1969; Ernst et al., 1971; Haapala, 1970), sistemi questi comuni sia agli animali che alle piante. Nelle piante, in particolare, la germinazione dei semi e la crescita delle radici nei primi stadi di sviluppo, appaiono i processi che maggiormente possono venire influenzati dall'azione dei tensioattivi. Sull'argomento esistono numerose ricerche sperimentali, fra le quali quelle più significative sono le seguenti:

Northen (1964) ha rilevato che la concentrazione di 10.000 ppm di detergente impediva la germinazione di semi di radicchio, mentre concentrazioni di 100 e 1000 ppm avevano poco effetto nei confronti di semi di pisello, radicchio e aneto. Detto Autore ha riscontrato pure che, in genere, i prodotti aventi struttura di esteri di acidi grassi con polietilen sorbitano avevano una azione inibitrice sullo sviluppo delle radici, inferiore a quella di prodotti aventi struttura di etere o di etere alcoli:

Mitiska e Kolář (1966) hanno riportato che i detergenti non ionici risultavano non tossici per i semi di senape e di rapa, mentre quelli cationici e anionici risultavano tossici al di sopra di 2,5 e 20 ppm, rispettivamente.

Knauth (1966), sperimentando in campo con acque di irrigazione contenenti aril o alchilsolfonati, oleil-N-metil = taurina, oppure ottilfenil ottilglicoletere, non ha osservato alcun effetto negativo sia sul suolo che sulle piante.

Parr e Norman (1964), sperimentando 22 tensioattivi, hanno trovato che ben 14 di essi avevano azione negativa sullo sviluppo delle radici di piantine di orzo e di cetriolo fatte germinare e crescere in soluzione nutritiva.

Prill et al., (1949) hanno rilevato che tra i prodotti da loro sperimentati, quelli del tipo ionico, unitamente ai fosfatidi estratti dalla soia, avevano, a basse concentrazioni, una azione depressiva molto limitata sulle radici del frumento; il contrario a concentrazioni molto elevate. D'altra parte gli stessi Autori hanno trovato che una sostanza naturale, la saponina, pur essendo del tipo non ionico presentava una azione inibitrice analoga a quella dei tensioattivi anionici e cationici alcuni dei quali esplicavano una azione nociva ben definita già alla concentrazione di 20 ppm.

Rotini (1961) e Rotini et al. (1961), studiando l'influenza di alcuni detergenti sullo sviluppo delle radici di bulbi di cipolla, hanno rilevato che la concentrazione della soglia antimitotica risultava dello 0,025% per l'alchilarilsolfonato sodico e il diottilsolfosuccinato sodico, mentre era dello 0,1% per il laurilsolfonato sodico e l'oleato sodico. Gli stessi Autori, sperimentando con altre piante, hanno riportato che la concentrazione della soglia antimitotica del diottilsolfosuccinato sodico si differenziava a seconda della specie di pianta.

Goldberg-Federico et al. (1966) e Vandoni e Goldberg-Federico (1973) hanno rilevato che il dodecilbenzensolfonato sodico, il cloruro di laurildimetilbenzilammonio e il no=



nilfenolo ossietilato, applicati al terreno, esercitavano una influenza negativa sulla germinabilità e sulla crescita di varie specie erbacee, avvertibile, nella maggioranza dei casi, già alla concentrazione dello 0,025%.

Buchanan (1965), esaminando l'azione di circa un centinaio di tensioattivi sulla germinabilità dei semi e sulla crescita delle radici di piante di varie specie, ha trovato che i tensioattivi del tipo non ionico dimostravano livelli di tossicità oscillanti da "estremamente tossico" come i prodotti della serie Triton (ottilfenil polietossi etanolo), a "relativamente non tossico" come i prodotti della serie Igepal Co (nonilpolifenossi (etilenossi) etanolo). Sulla base dei risultati ottenuti l'Autore è arrivato alla conclusione che non era possibile classificare i tensioattivi come tossici o non tossici solamente in base al gruppo ionogenico di appartenenza.

Altri Autori, d'altro canto, hanno riportato addirittura azioni favorevoli dei tensioattivi sulla crescita delle piante. Così, ad esempio, Prill et al. (1949) hanno trovato due tensioattivi aventi azione stimolante sulla crescita delle radici di frumento, quando venivano impiegati a concentrazione molto bassa. Anche Stowe (1958) ha riportato che alcuni tensioattivi stimolavano la crescita di sezioni di ipocotile di pisello. Successivamente però, lo stesso Autore (Stowe, 1960), sperimentando diversi altri tensioattivi non ionici a varie concentrazioni (nonilfenossi polioossietilene e polioossipropilene polioossietilene condensati) non ha trovato alcuna azione stimolante sullo sviluppo delle radici; pure inattivi, come stimolanti, sono risultati i tensioattivi cationici, alcuni dei quali avevano, invece, azione depressiva.

Da quanto sopra esposto risulta che la previsione delle proprietà fitotossiche dei tensioattivi in base alla loro natura chimica non è sempre possibile. Pertanto, al fine di avere informazioni più specifiche circa la fitotossicità di nuovi tipi di detergenti, sono state eseguite delle espe =

rienze di laboratorio, aventi lo scopo di studiare gli effetti di alcuni prodotti sulla germinabilità dei semi e sulla crescita della parte aerea e dell'apparato radicale di alcune specie di piante erbacee coltivate.

In questa prima serie di esperienze, l'obiettivo principale è stato quello di ricercare il limite di concentrazione più elevato, di ciascuno dei dieci detergenti sperimentati, compatibile con il normale sviluppo delle varie specie di piante prese in esame. E ciò per poter dare - definendo le "concentrazioni limite" - dimensioni reali al problema dell'inquinamento delle acque di irrigazione causato dai detergenti sperimentati.

#### MATERIALI E METODI

Poichè l'eventuale azione nociva delle acque di irrigazione inquinate da detergenti riguarda maggiormente le colture erbacee, data la maggiore probabilità che esse hanno di essere irrigate, e fra queste particolarmente le foragere, i cereali e le colture orticole, si sono impiegate le specie vegetali elencate nella Tabella 1 (Treccani degli Alfieri, 1971).

TABELLA 1 - Piante utilizzate nelle esperienze

---

1 Avena (Avena sativa)	6 Loietto (Lolium ital.)
2 Erba medica (Medic. sat.)	7 Orzo (Hordeum vulgare)
3 Frumento (Trit. vul.)	8 Pomodoro (Lycop. esc.)
4 Granoturco (Zea mays)	9 Riso (Oryza sativa)
5 Lattuga (Lactuga sat.)	

---

I principi attivi sperimentati in questa serie di prove sono elencate nella Tabella 2.

Ogni prodotto è stato sperimentato a 6 concentrazioni, e precisamente a 0, 50, 100, 200, 400, 800 ppm. Esperienze preliminari dimostrarono, infatti, che le concentrazioni inferiori, in un primo tempo programmate, e cioè 0, 1, 10, 30 ppm, non provocavano alcun effetto evidente sullo sviluppo delle plantule e degli apparati radicali.

TABELLA 2 - Detergenti sperimentati

Detergente	Composizione Chimica
1	DODECILBENZENSOLFONATO SODICO, LINEARE (C <sub>10</sub> -5%, C <sub>11</sub> -38%, C <sub>12</sub> -30%, C <sub>13</sub> -22%, C <sub>x</sub> ±5%) (Peso mol. 343. Tipo anionico)
2	DODECILBENZENSOLFONATO SODICO, RAMIFICATO (Peso mol. 348. Tipo anionico)
3	DODECILBENZENSOLFONATO SODICO, LINEARE (C <sub>10</sub> -13%, C <sub>11</sub> -28%, C <sub>12</sub> -25%, C <sub>13</sub> -24%, C <sub>14</sub> -10%) (Peso mol. 348. Tipo anionico)
4	ALCOOLI DA SEGO + 25 MOLI DI OSSIDO DI ETILENE (Peso mol. 1350. Tipo non ionico)
5	ALCOOLI DA SEGO + 11 MOLI DI OSSIDO DI ETILENE (Peso mol. 650. Tipo non ionico)
6	ALCOOLI DA COCCO SOLFATI (Peso mol. 309. Tipo anionico)
7	DODECILBENZENSOLFONATO SODICO, LINEARE (C <sub>10</sub> -5%, C <sub>11</sub> -48%, C <sub>12</sub> -35%, C <sub>13</sub> -12%) (Peso mol. 342. Tipo anionico)

- 8                     $\alpha$ -OLEFINE SOLFONATE C<sub>16</sub>  
                      (Peso mol. 320. Tipo anionico)
- 9                    ALCALSOLFONATO SODICO  
                      (Peso mol. 305. Tipo anionico)
- 10                   SAPONE SODICO (Cocco-15%, sego-85%)  
                      (Peso mol. 283. Tipo anionico)
- 

Le concentrazioni impiegate sono state calcolate in base al contenuto in principio attivo dei vari prodotti, molti dei quali erano puri al 100%. L'acqua distillata è stata il solo solvente utilizzato per la preparazione delle varie soluzioni; queste sono servite per imbibire fino a saturare i fogli di carta da filtro sui quali si sono fatti germinare i semi delle varie piante.

Per ogni prova, circa 30 semi sono stati distribuiti su un foglio di carta da filtro (25x100-150 cm) posto in posizione orizzontale in apposito vassoio ed imbevuto con ognuna delle concentrazioni dei vari prodotti sperimentati. I semi sono stati disposti in fila sul lato maggiore del foglio, alla distanza di 3-4 cm l'uno dall'altro a seconda della specie. Dopo la deposizione dei semi, il foglio è stato arrotolato su se stesso in modo da formare un cilindro alto 25 cm, che veniva poi posto in un bicchiere contenente la soluzione in esame. I semi venivano così a trovarsi nella parte superiore del cilindro e nello stesso tempo risultavano a contatto con la soluzione di cui la carta era imbevuta.

I rotoli di carta portanti i semi sono poi stati messi in una camera di crescita, alle condizioni di temperatura e di umidità relativa consigliate dai Metodi Ufficiali (Ministero Agric. e Foreste, 1965) per la determinazione della germinabilità dei semi.

Con la procedura descritta veniva favorito il processo germinativo, lo sviluppo delle plantule e degli apparati radicali, ed evitata l'evaporazione dell'acqua; inoltre le radici potevano facilmente estendersi tra foglio e foglio ed assumere un andamento dall'alto verso il basso (geotropismo positivo) che è a loro naturale. Al contrario nei comuni germinatoi le radici sono costrette a svilupparsi in senso orizzontale, inoltre esse si intrecciano fra di loro, per cui diventa difficile la loro misurazione.

Alla fine del periodo di germinazione, variabile a seconda delle specie da 6 a 11 giorni, ogni rotolo di carta veniva srotolato, dopo di che si procedeva alla misurazione dello sviluppo dell'apparato radicale, oltre che quello della parte aerea delle singole piantine.

I parametri presi in considerazione in ogni prova sono stati: 1) germinabilità; 2) sviluppo della parte aerea della plantula; 3) sviluppo dell'apparato radicale.

In questa ricerca, un seme è stato considerato germinato quando la radichetta aveva attraversato il tegumento esterno del seme ed aveva raggiunto una lunghezza pari a circa la lunghezza del seme. Lo sviluppo della parte aerea è stato misurato dall'altezza della pianticella; quello dell'apparato radicale dalla lunghezza della radice principale più lunga.

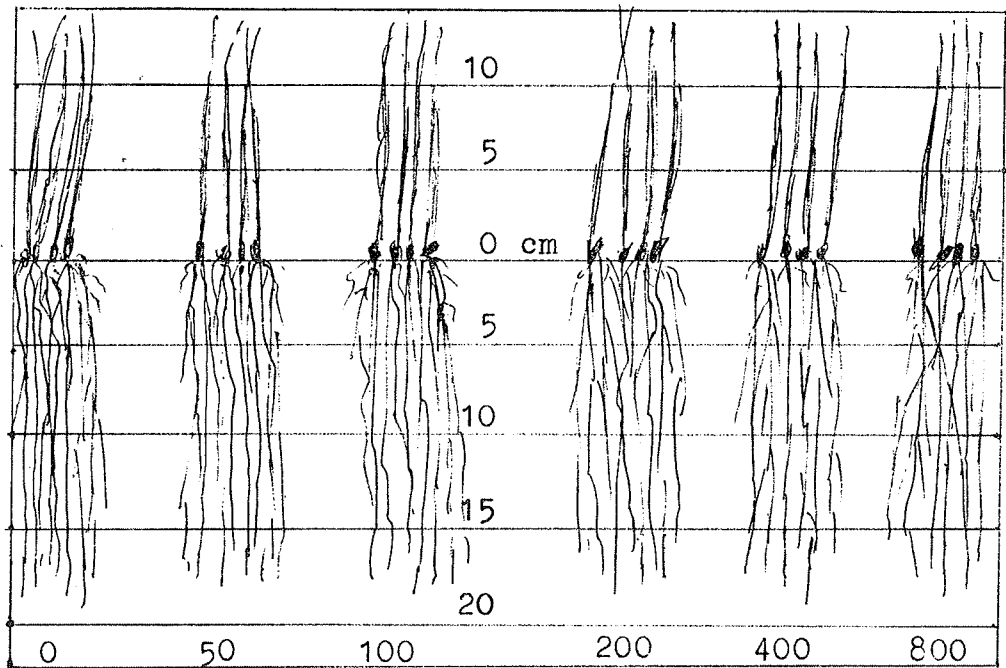
Per sviluppo normale si è assunto quello raggiunto dalle piante cresciute sulla carta da filtro imbevuta di solo acqua distillata (testimone).

Le concentrazioni dei vari prodotti che hanno in qualche modo limitato lo sviluppo normale della parte aerea o dell'apparato radicale sono state indicate come "concentrazioni inibitrici". Per "concentrazione limite" si è invece indicato il valore della concentrazione che precedeva, nell'ordine crescente delle varie concentrazioni sperimentate, la concentrazione inibitrice.

## RISULTATI OTTENUTI E DISCUSSIONE

Fin dalle prime prove è risultato che il parametro germinabilità, almeno per le concentrazioni prese in considerazione in questa serie di esperienze, costituiva un parametro poco sensibile per rilevare l'effetto dei vari prodotti e delle loro differenti concentrazioni. È risultato, infatti, che spesso il numero dei semi germinati delle prove ad elevata concentrazione di principio attivo non differiva significativamente da quello delle prove con concentrazioni più basse. Pertanto tale parametro non è stato ulteriormente considerato. Lo sviluppo dell'apparato radicale è risultato, invece, il parametro più significativo; da altro canto, la parte aerea è stata influenzata, nel caso di talune piante e a certe concentrazioni, solo da qualche prodotto. In alcune prove, infatti, l'azione dei vari detergenti sullo sviluppo della parte aerea delle pianticelle è risultata trascurabile anche laddove la riduzione di sviluppo dell'apparato radicale risultava chiaramente evidente. Tale comportamento si può spiegare con il fatto che le piantine nel primo periodo di crescita possono svilupparsi a spese delle riserve del seme. Inoltre, nei semi in cui lo sviluppo delle radici risulta depresso potrebbe restare disponibile una certa quantità di sostanze di riserva per lo sviluppo della parte aerea. Ne deriva che per questo tipo di prove, la sola osservazione della crescita della parte aerea può risultare non significativa.

L'aspetto delle piantine trattate con concentrazioni crescenti di detergente può essere osservato nelle Figure 1 e 2 nelle quali sono illustrati gli effetti dei prodotti 4 e 9 su piantine di frumento.



Concentrazione del detergente (ppm)

FIGURA 1 - Influenza del detergente n. 4 (alcooli di sego + 25 moli di ossido di etilene) su piantine di frumento, a 7 giorni di età.

Per ogni specie vegetale e per ogni prova, le dimensioni della parte aerea e dell'apparato radicale delle piante, sono state espresse come valori percentuali delle rispettive dimensioni del testimone fatte uguali a 100. Il confronto dei vari prodotti è reso così più facile, in particolare è interessante quello con il sapone usato alle stesse concentrazioni.

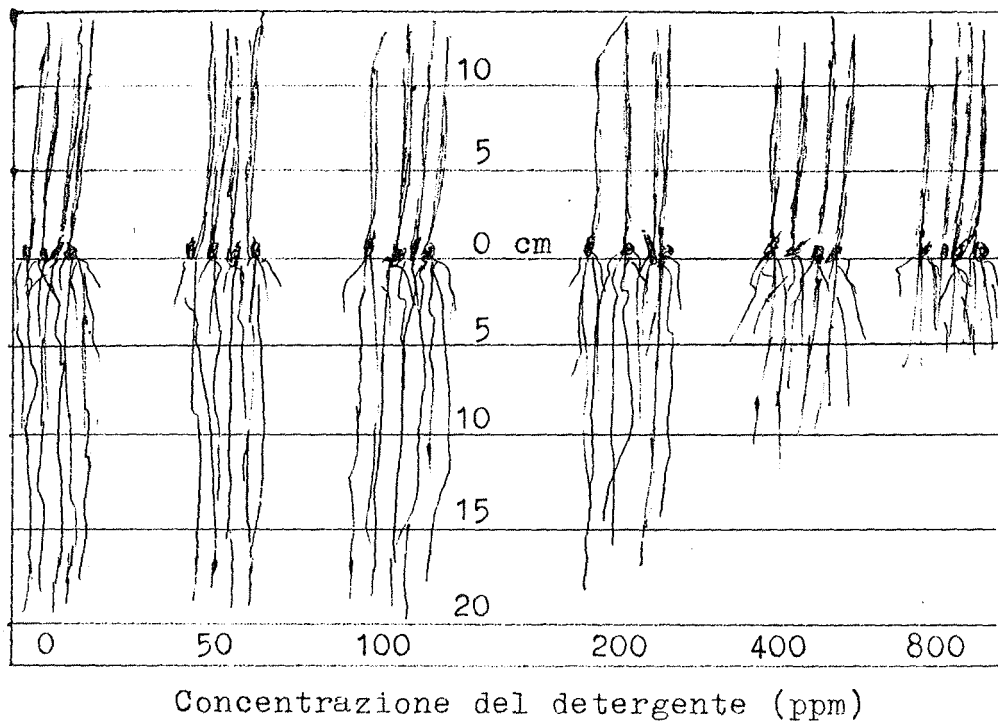


FIGURA 2 - Influenza del detergente 9 (alcansolfonato sodico) su piantine di frumento, a 7 giorni di età.

A titolo di esempio, nella Tabella 3 si riportano i dati ottenuti con le piante di avena trattate con le differenti concentrazioni dei vari detergenti sperimentati. Ogni valore riportato in questa tabella rappresenta la media di tre ripetizioni; i valori contrassegnati con un asterisco si differenziano dal testimone in modo significativo a  $P = 0,05$ ; quelli con due asterischi a  $P = 0,01$ . I valori delle concentrazioni che hanno causato uno sviluppo della parte aerea o dello apparato radicale significativamente in



feriore (a  $P = 0,05$ ) al rispettivo sviluppo del testimone, sono considerati concentrazioni inibitrici. Per ogni detergente e per ogni specie di pianta la concentrazione che precedeva la concentrazione inibitrice è stata indicata, come già precisato, concentrazione limite.

TABELLA 3 - Dimensioni relative al testimone, fatto uguale a 100, della parte aerea e delle radici di piante di avena misurate a 7 giorni dal trattamento con le varie concentrazioni dei detergenti. I valori sono la media di 3 ripetizioni.

Detergente	C o n c e n t r a z i o n e in p p m					
	0	50	100	200	400	800
	<u>Altezza delle piante</u>					
1	100	101	101	98	102	90*
2	100	101	100	96	92	77*
3	100	101	101	98	98	85*
4	100	97	100	98	99	100
5	100	101	99	99	99	98
6	100	100	101	100	97	99
7	100	98	100	99	102	98
8	100	103	100	99	99	95
9	100	103	103	98	94	73**
10	100	101	99	99	101	100
	<u>Lunghezza delle radici</u>					
1	100	99	96	84	63*	20**
2	100	98	97	88	59*	25**
3	100	99	98	68*	57*	28**
4	100	97	95	91	90	91
5	100	97	93	89*	69**	59**
6	100	99	101	90	84**	48**
7	100	99	94	86**	46**	19**
8	100	99	98	85**	74**	45**
9	100	100	99	98	95	76**
10	100	100	99	100	99	99

(\*)  $P = 0,05$

(\*\*)  $P = 0,01$

I valori delle suddette concentrazioni limite sono esposti nelle Tabelle 4 e 5, rispettivamente, per la parte aerea e per l'apparato radicale delle piante.

TABELLA 4 - Valori delle concentrazioni limite dei detersivi, nei confronti della parte aerea delle piante. I valori delle concentrazioni sono in ppm.

Detergente	S p e c i e v e g e t a l i				
	Avena	Erba medica	Frumento	Granoturco	Lattuga
1	400	400	400	400	400
2	400	400	400	200	100
3	400	400	400	200	400
4	>800	>800	>800	>800	>800
5	>800	>800	400	>800	100
6	>800	400	100	400	100
7	>800	50	400	200	200
8	>800	100	200	100	100
9	400	50	100	50	100
10	>800	>800	>800	>800	>800
	Loiutto	Orzo	Pomodoro	Riso	
1	200	>800	200	100	
2	200	>800	200	50	
3	400	>800	200	100	
4	>800	>800	>800	400	
5	100	>800	50	50	
6	400	200	100	100	
7	50	200	100	100	
8	200	400	50	200	
9	50	100	50	50	
10	>800	>800	>800	>800	

TABELLA 5 - Valori delle concentrazioni limite dei detergenti nei confronti dell'apparato radicale delle piante. I valori delle concentrazioni sono in ppm.

Detergente	Specie vegetale				
	Avena	Erba medica	Frumento	Granoturco	Lattuga
1	200	200	200	100	100
2	200	200	200	200	200
3	100	200	200	200	100
4	>800	>800	>800	>800	>800
5	100	100	100	100	100
6	100	200	100	100	100
7	100	50	50	200	50
8	100	200	50	200	50
9	400	200	100	100	<50
10	>800	>800	>800	>800	>800
	Loiutto	Orzo	Pomodoro	Riso	
1	100	400	400	100	
2	100	400	200	100	
3	100	400	400	100	
4	>800	>800	>800	>800	
5	50	200	800	100	
6	200	100	200	50	
7	50	200	50	100	
8	50	200	50	200	
9	200	200	<50	100	
10	>800	>800	>800	>800	

Nella Tabella 6 vengono riportati, invece, i valori minimi delle concentrazioni limite dei vari detergenti nei confronti della parte aerea o dell'apparato radicale delle piante.

TABELLA 6 - Valori delle concentrazioni limite dei detergenti nei confronti della parte aerea o dell'apparato radicale delle piante. I valori delle concentrazioni sono in ppm.

Detergente	Specie vegetale				
	Avena	Erba medica	Frumento	Granoturco	Lattuga
1	200	200	200	100	100
2	200	200	200	200	100
3	100	200	200	200	100
4	>800	>800	>800	>800	>800
5	100	100	100	200	100
6	100	200	100	100	100
7	100	50	50	200	50
8	100	100	50	100	50
9	400	50	100	50	<50
10	>800	>800	>800	>800	>800
Media (*)	162	137	125	143	74
	Loiutto	Orzo	Pomodoro	Riso	Media di tutte le specie
1	100	400	200	100	178
2	100	400	200	50	183
3	100	400	200	100	178
4	>800	>800	>800	400	>756
5	50	200	50	50	106
6	200	100	100	50	117
7	50	200	50	100	94
8	50	200	50	200	100
9	50	100	50	<50	100
10	>800	>800	>800	>800	>800
Media (*)	87	250	112	67	

(\*) Media con esclusione dei detergenti 4 e 10.

I detergenti 1, 2 e 3 (dodecilbenzensolfonati sodici), tutti del tipo anionico, hanno manifestato una concentrazione limite, media di tutte le specie, sulle 180 ppm. Il prodotto 2, pur avendo struttura ramificata, non si è diversificato dagli altri due aventi struttura lineare; d'altro canto, il detergente 7, avente la stessa natura chimica dei primi tre e struttura lineare, ha presentato una concentrazione limite pari a circa la metà (94 ppm).

I detergenti 4 e 5, entrambi alcoli da sego, rispettivamente con 25 e 11 moli di ossido di etilene, e di tipo non ionico, hanno presentato concentrazioni limite molto diverse fra loro. Il prodotto 4 non ha presentato, infatti, alcuna azione nociva nei confronti di quasi tutte le piante anche alla concentrazione di 800 ppm, mentre per il detergente 5 la concentrazione limite media è risultata di 106 ppm. Per quanto riguarda questi due detergenti è interessante notare come il maggior numero di moli di ossido di etilene del prodotto 4, rispetto al 5, dà al detergente 4 carattere non tossico anche a concentrazione elevata. Questo risultato è in accordo con quelli ottenuti da Buchanan (1965) il quale ha trovato che fra i tensioattivi non ionici della serie Triton, la fitotossicità sullo sviluppo delle radici decresceva all'aumentare del numero delle moli di ossido di etilene dei composti sperimentati. Questa differenza di azione in funzione del numero delle moli di ossido di etilene è stata pure messa in evidenza da Marchetti (1964) nei confronti dei pesci. Per tali organismi, infatti, sembra esistere una correlazione positiva tra i valori della concentrazione tossica e il numero delle molecole di ossido di etilene dei composti polietossilati.

Il detergente 6, alcoli da cocco solfati, di tipo anionico, ha presentato una concentrazione limite media sulle 117 ppm; dello stesso ordine di grandezza (100 ppm) sono pure risultate le concentrazioni limite medie dei detergenti 8 ( $\alpha$ -olefine solfonate  $C_{16}$ ) e 9 (alcansolfonato

sodico), entrambi del tipo anionico.

Infine il detergente 10, costituito da sapone sodico, non ha presentato alcuna azione nociva nei confronti di tutte le piante anche quando è stato sperimentato alla concentrazione di 800 ppm. Questo ultimo risultato concorda con i dati sperimentali trovati da Rotini et al. (1961) circa l'azione dell'oleato sodico sullo sviluppo delle radici di bulbi di cipolla.

#### CONCLUSIONI

Dai dati ottenuti in queste esperienze risulta che i detergenti sperimentati, solo quando sono stati impiegati a concentrazioni relativamente elevate, esercitano una netta influenza negativa sulla crescita della parte aerea e soprattutto dell'apparato radicale nei primi stadi di sviluppo. Inoltre detta influenza negativa è risultata variare in funzione dei detergenti ed anche delle specie di piante utilizzate.

Il detergente 4 (alcooli da sego + 25 moli di ossido di etilene) e il detergente 10 (sapone sodico) non hanno manifestato effetti nocivi anche alla concentrazione più elevata (800 ppm) ad eccezione del riso per il prodotto 4.

Per tutti gli altri detergenti i valori delle concentrazioni limite sono risultati compresi, in genere, tra 200 e 50 ppm; fanno eccezione i primi tre detergenti, che nei confronti dell'orzo hanno presentato valori di 400 ppm, e il prodotto 9 che talvolta ha presentato una influenza negativa sullo sviluppo delle radici già alla concentrazione di 50 ppm. D'altra parte i valori medi delle concentrazioni limite dei singoli detergenti nei confronti di tutte le specie di piante sono risultati compresi fra 183 e 94 ppm.

I risultati ottenuti in queste prove confermano come alcuni composti con composizione chimica sostanzialmente diversa possono presentare valori di concentrazione limite

quasi uguali, mentre altri composti chimicamente molto simili possono presentare concentrazioni limite assai differenti. Inoltre le singole specie di piante esaminate hanno presentato una diversa sensibilità alla azione dei detergenti. In genere, la lattuga, il loietto e il riso sembrano essere le piante più sensibili, con valori delle medie delle concentrazioni limite nei confronti di tutti i detergenti (escluso il 4 e il 10), compresi fra 74 e 87 ppm; l'orzo, d'altro canto, è risultato il più resistente presentando una media delle concentrazioni limite di 250 ppm.

In conclusione, sulla scorta dei risultati ottenuti in questa serie di esperienze, si constata che il problema dell'inquinamento delle acque di irrigazione dei detergenti sperimentati, relativamente alla loro azione nociva sulla germinabilità dei semi e sulla crescita della parte aerea e degli apparati radicali nei primi stadi di sviluppo delle piante, non dovrebbe destare eccessive preoccupazioni. Infatti, almeno nelle condizioni sperimentali descritte, i valori delle concentrazioni alle quali i prodotti sperimentati hanno iniziato a svolgere qualche azione nociva evidente, sono risultati estremamente superiori a quelli normalmente trovati nelle acque dei fiumi (Arpino et al., 1973) e nelle acque irrigue (Rossi, 1974).

BIBLIOGRAFIA

- Arpino A., Ruffo C., Jacini G. (1973) Riv. Ital. Sost. Grasse 50, 345.
- Buchanan G.A. (1965) Iowa State Univ. of Sci. and Technol. Ph.D., Botany, Ames, Iowa, U.S.A.
- Endo R.M., Letey J., Valoras N., Osborn J.F. (1969) Agron. J. 81, 850.
- Ernst R., Arditti J., Healey P.L. (1971) New Phytol. 70, 457.
- Goldberg-Federico L., Vandoni M.V., Garoia (1966) Chimica 42, 293.
- Haapala E. (1970) Physiol. Plant. 23, 187.
- Knauth H. (1966) Wass. Wirt. Wass. Tech. 16, 64.
- Marchetti R. (1964) Riv. Ital. Sost. Grasse 41, 533.
- Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste (1965) in Met. Uff. Anal. Sementi. Ist. Pol. Stato, Roma.
- Mitiska J., Kolář L. (1966) Sb. Prov. Econ. Fac. Vys. Sk. Zeměd. Česk. Bud. Polytem. Rada 4, 35.
- Northen H.T. (1964) Plant. Physiol. Annual Meetings Proc. 39, 36.
- Parr J.F., Norman A.G. (1964) Plant. Physiol. 39, 502.
- Prill E.A., Barton L.V., Solt M.L. (1949) Boyce Thompson Institute Contributions 15, 311.



Rossi N. (1974) In corso di stampa.

Rotini O.T., Guerrucci N., Maffei L. (1961) Ric.Sci. 31  
(II-B), 30.

Rotini O.T. (1961) La Chimica e l'Industria 43, 159.

Sirakov L.M., Schulga A.V. (1971) Life Sci. 10, 1321.

Stowe B.B. (1958) Science 28, 421.

Stowe B.B. (1960) Plant Physiol. 35, 262.

Treccani degli Alfieri V. (1971) Ist.Microb.Agr.Univ.Mila=  
no. Comunicazione personale.

Vandoni M.V., Goldberg-Federico L. (1973) Riv.Ital.Sost.  
Grasse 50, 357.

t.Uff.

Ed.

39,

n

ATRAZINA, SIMAZINA, TERBUTRINA E ALACLORO NEL DISERBO DEL  
MAIS. STUDIO DELLA FITOTOSSICITA' RESIDUA (\*)

S. Miele, G.P. Vannozzi  
Istituto di Agronomia, Università di Pisa

RIASSUNTO

Gli Autori si riferiscono circa l'efficacia erbicida dell'atrazina, variamente miscelata con alacloro, simazina e terbutrina, sulle infestanti del mais e sui possibili effetti residui che tali prodotti possono espletare su colture in successione, quali: frumento tenero, barbabietola da zucchero, girasole ed erba medica.

Alle maggiori dosi sperimentate ( 8 Kg/ha p.f.) i diserbanti impiegati hanno consentito un buon controllo delle avventizie monocotiledoni presenti: Alopecurus myosuroides e Lolium spp., senza che sul mais si siano manifestati effetti fitotossici.

Relativamente alla attività residua dei principi impiegati la maggiore tossicità è stata rilevata in corrispondenza dei trattamenti a base di atrazina e atrazina + simazina (8 Kg/ha p.f.).

Il fenomeno si è estrinsecato in maniera evidente su tutte le colture. In particolare è stato rilevato:

- su frumento tenero, minore resa granellare e marcata diminuzione del peso unitario delle cariossidi;
- su barbabietola da zucchero, elevata mortalità iniziale delle plantule, alterato sviluppo biologico con conseguente diminuzione della resa in radici e del contenuto zuccherino di queste;

---

(\*) Il testo del presente lavoro risulta pubblicato su "L'Agricoltura Italiana" A.LXXIV (XXIX n.s.), n. 2, 1974

- su girasole, minore sviluppo in altezza delle piante e significativo calo di produzione con relativo abbassamento del contenuto in olio negli acheni;
- su erba medica, ritmo di accrescimento più lento e inferiore produzione di foraggio fresco al primo taglio.

## EFFETTO DI TENSIOATTIVI SU ALCUNE SPECIE VEGETALI

A. Luzzati

Istituto sperimentale per la nutrizione delle piante, sezione operativa periferica di Torino.

Sono state effettuate alcune esperienze in vaso e in campo per studiare l'azione di tensioattivi diversi sulla produzione vegetale di alcune specie e sulla composizione chimica dei prodotti ottenuti. (\*)

In una prima esperienza, in vaso, di carattere orientativo su avena, lino e pisello, sono state somministrate al terreno, prima della semina, quantità molto elevate di tensioattivi, da 250 a 8000 ppm che, nelle condizioni sperimentali adottate, corrispondono a circa 2,5 e 80 q/ha: tali quantità erano in realtà alquanto superiori a quelle talvolta presenti nelle acque superficiali; tuttavia un'elevata concentrazione di tensioattivi nel terreno può verificarsi per lo scarico diretto di effluenti industriali o urbani.

Sono stati usati: un tensioattivo anionico (dodecilsolfonato a catena ramificata), un non ionico (ottilfenolo con catena ramificata condensato con 10 molecole di ossido di etilene) e un cationico (solfato di stea-roiletildietanolammonio).

Il tensioattivo non ionico e soprattutto l'anionico hanno manifestato effetti depressivi sulla crescita di tutte e tre le piante già alla dose di 250 ppm; il cationico ha provocato invece variazioni alquanto irregolari della resa e in ogni caso ha consentito produzioni vegetali notevolmente superiori a quelle ottenute in presenza degli altri due tensioattivi (tab. 1).

---

(\*) Su queste esperienze sono state pubblicate tre note nel "Bollettino dei Laboratori Chimici Provinciali", 25, 43, 60, 112 (1974).

Per quanto riguarda l'influenza dei tensioattivi sull'assimilazione di elementi nutritivi, si è osservato che tutti e tre hanno provocato nelle piante di avena e lino l'aumento delle ceneri, del calcio e del potassio e nei semi di pisello la diminuzione delle ceneri, dell'azoto, del fosforo e del potassio.

Nella seconda esperienza in vaso, sono state usate su avena, trifoglio e erba medica quantità più basse dei tensioattivi anionico e non ionico precedenti: da 62,5 a 1000 ppm, pari a 0,63 e 10 q/ha. L'avena si è rivelata la specie vegetale più resistente fra quelle sperimentate, mentre a concentrazioni elevate si è ancora una volta constatato che il tensioattivo anionico è il più tossico per le colture (tab. 2).

Le due esperienze in pieno campo sono state compiute rispettivamente sul pisello e sulla patata, somministrando i due tensioattivi, l'anionico e il non ionico, in dosi varianti da 0,5 a 32 q/ha.

Nel caso del pisello, il trattamento con 32 q/ha di entrambe le sostanze ha provocato diminuzioni di resa statisticamente significative: si è notato un maggior effetto depressivo sulla produzione di baccelli rispetto alla produzione vegetale complessiva (tab. 3). I due tensioattivi hanno causato lievi variazioni in alcune caratteristiche del terreno, quali il pH (che è diminuito), l'azoto totale e ammoniacale (che sono aumentati) e l'indice di struttura (che è aumentato) e hanno provocato un considerevole aumento dell'azoto nitrico (tab. 4).

Nel caso delle patate, il tensioattivo non ionico ha dimostrato un'azione depressiva sulla produzione superiore a quella dell'anionico; entrambi i tensioattivi hanno provocato sensibili aumenti del contenuto in ceneri, protidi e potassio dei tuberi (tab. 5). Si è potuto anche osservare che le due sostanze hanno causato una fortissima inibizione, superiore all'84%, dell'attività deidrogenasica del terreno.

TABELLA 1 - Produzione media di avena, lino e pisello in presenza dei tre tensioattivi (g di sostanza secca prodotta per vaso)

Trattamenti		avena	lino	pisello
tensioattivo	ppm			
	0	56	37	23
anionico	250	48	27	17
anionico	500	42	22	15
anionico	1000	8	8	4
anionico	2000	2	3	2
anionico	4000	2	0,5	2
anionico	8000	1	0,5	1
non ionico	250	56	35	20
non ionico	500	56	32	17
non ionico	1000	48	29	11
non ionico	2000	21	16	9
non ionico	4000	3	4	3
non ionico	8000	0,5	1	1
cationico	250	57	35	20
cationico	500	58	33	17
cationico	1000	53	32	17
cationico	2000	52	39	16
cationico	4000	58	35	14
cationico	8000	61	26	11

TABELLA 2 - Produzione media di avena, trifoglio e erba medica in presenza dei due tensioattivi (g di sostanza secca prodotta per vaso)

Trattamenti		avena	trifoglio	erba medica
tensioattivo	ppm			
	0	67	27	19
anionico	62,5	67	26	22
anionico	125	67	21	22
anionico	250	66	23	18
anionico	500	46	10	11
anionico	1000	9	0	0
non ionico	62,5	63	28	17
non ionico	125	62	24	15
non ionico	250	61	20	12
non ionico	500	56	17	8
non ionico	1000	44	10	4

TABELLA 3 - Produzione di piselli per parcella, espressa in kg di peso secco (media di quattro ripetizioni)

Trattamenti		piante complete	baccelli
tensioattivo	q/ha		
	0	3,66	2,39
anionico	0,5	4,29	2,46
anionico	1	3,48	2,41
anionico	2	3,74	2,34
anionico	4	3,60	2,28
anionico	8	3,54	2,27
anionico	16	2,91	1,77
anionico	32	2,13	1,38
non ionico	0,5	3,68	2,57
non ionico	1	3,64	2,60
non ionico	2	3,78	2,37
non ionico	4	3,33	2,12
non ionico	8	3,14	1,97
non ionico	16	3,31	1,59
non ionico	32	1,76	1,14



TABELLA 4 - Caratteristiche chimiche dei terreni al termine della coltura del pisello (media di quattro ripetizioni)

Trattamenti		pH	C.S.C. me/100 g	sostanza organica %	N totale %	N ammoniacale ppm	N nitrico ppm
tensioattivo	q/ha						
	0	7,95	16	3,19	0,22	5	10
anionico	4	7,60	16	3,12	0,25	5	60
anionico	32	7,80	16	3,12	0,23	10	60
non ionico	4	7,85	17	3,25	0,28	5	50
non ionico	32	7,85	15	3,32	0,24	5	50

TABELLA 5 - Composizione chimica delle patate (sulla sostanza secca)

Trattamenti		ceneri	protidi	fibra	P	Ca	Mg	K
tensioattivo q/ha		%	%	%	%	%	%	%
	0	5,48	13,63	2,10	0,38	0,10	0,14	2,66
non ionico	4	5,88	13,78	2,16	0,39	0,10	0,16	2,83
non ionico	32	5,80	14,03	1,87	0,39	0,09	0,14	2,82
anionico	4	5,95	13,41	2,17	0,40	0,11	0,15	2,89
anionico	32	5,66	14,52	2,20	0,37	0,09	0,14	2,79

INQUINAMENTO DA ZINCO, RAME E PIOMBO NEL SUOLO  
DELL'AREA URBANA ED INDUSTRIALE DI NAPOLI.

G. Basile, F. Palmieri, P. Violante  
Istituto di Chimica Agraria, Università di Napoli

I risultati di molte ricerche condotte negli ultimi anni per l'accertamento dell'inquinamento del suolo hanno indicato che quantità notevoli di metalli pesanti si accumulano nelle aree urbane, in prossimità di agglomerati industriali o lungo autostrade a forte densità di circolazione (I,5,7,9,II,I2,I3,I4,I6).

In questa Nota si dà conto dei risultati del rilevamento condotto per valutare il grado di contaminazione da zinco, rame e piombo nell'area urbana e in quelle industriali e autostradali di Napoli.

Il suolo della zona presa in esame deriva dall'altezzazione dei prodotti piroclastici del Vesuvio e dei Campi Flegrei.

L'area urbana e quella industriale verso ovest si imbasano su potenti banchi di tufo pipernoide o di vulcaniti incoerenti, mentre i materiali che si trovano in superficie nelle aree industriali e autostradali verso est derivano da costituenti frammentari lanciati nelle fasi di esplosione del Vesuvio, molto probabilmente non anteriormente al I63I.

Questi suoli, descritti in molti lavori (2,3), sono porosi e permeabili, sono caratterizzati da reazione prossima alla neutralità, da modesto contenuto in sostanza organica, da prevalenza della frazione sabbiosa, da capacità di scambio poco elevata, da complessi di scambio saturi; nella loro frazione argillosa si accerta la presenza di halloysite e di metahalloysite e di materiale ad organizzazione cristallina non ben definita riferibile all'allofane (4).

I campioni sono stati prelevati nelle poche zone ancora coltivate all'interno del perimetro urbano, nei parchi e nei giardini pubblici, nelle aree industriali e nelle immediate vicinanze delle autostrade o dei raccordi autostradali.

Le metodiche analitiche seguite sono state quelle più volte riportate in letteratura. Più precisamente: per l'estrazione dello zinco e del rame è stata impiegata soluzione 0,05 N di  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , per l'estrazione del piombo soluzione 0,05 N di EDTA ammonico (pH 9).

I metalli sono stati determinati per spettrofotometria in assorbimento atomico mediante apparecchiatura Perkin-Elmer mod. 306. Le lunghezze d'onda impiegate sono state: per lo zinco 213,8 m $\mu$ , per il rame 324,7 m $\mu$ , per il piombo 283,3 m $\mu$ .

Sono stati analizzati 204 campioni differenziati secondo le zone di prelevamento. I risultati accertati sono stati comparati con quelli ottenuti dall'analisi condotta su campioni prelevati in aree rurali extraurbane, che debbono ritenersi non contaminate e, a diversa profondità, lungo due sezioni verticali a est e ad ovest della città.

Le medie dei valori analitici determinati, i coefficienti percentuali di variabilità e l'errore standard delle medie sono illustrati nella tabella I.

La distribuzione delle quantità estraibili di zinco rame e piombo lungo le sezioni studiate è riportata nella tabella 2.

L'analisi statistica dei dati dimostra che i campioni rappresentativi delle aree rurali extraurbane costituiscono una popolazione diversa rispetto a quella di ciascuno dei 4 gruppi considerati sia per lo zinco che per il rame ed il piombo, per la cui media si determinano differenze altamente significative con probabilità inferiori a 0,01. Questo, insieme con l'accentuata concentrazione in superficie che caratterizza la distribuzione delle quantità estraibili di zinco, rame e piombo lungo le due sezioni esaminate, conferma nell'atmosfera la principale fonte di inquinamento, di cui il suolo si dimostra un rivelatore sensibile (8).

Le aree industriali e quelle ai bordi delle autostrade risultano caratterizzate oltre che da più alti livelli di inquinamento, come dai valori analitici in tabella, anche da più elevati coefficienti di variabilità, particolarmente per il rame ed il piombo, a causa dei valori eccezionalmente elevati determinati in alcuni campioni.

Nel caso del rame, alcuni dati molto alti (I06-II0-I34-I40-I90-3I7 p.p.m.) fanno pensare a fonti di inquinamento diverse, concomitanti a quella costituita dal materiale sospeso nell'atmosfera, e difficilmente individuabili.

Per il piombo, invece, i valori apparentemente aberranti determinati in alcuni campioni possono non solo facilmente spiegarsi, quando se ne considera la prove-

Tabella I

Valori medi in p.p.m. dello zinco, del rame (estrazione con  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,05 N) e del piombo (estrazione con EDTA ammonico pH 9)<sup>2</sup>

Provenienza dei campioni	Numero dei campioni	Zinco			Rame			Piombo		
		media	$C_v \cdot 100$	E.S.	media	$C_v \cdot 100$	E.S.	media	$C_v \cdot 100$	E.S.
Aree rurali extraurbane	32	22,9	51,0	± 2,9	5,1	61,4	± 0,8	11,0	77,1	± 2,1
Aree coltivate urbane	53	49,1	71,7	± 4,8	48,8	72,8	± 4,9	41,3	55,9	± 3,2
Parchi e giard.pubbl.	42	57,2	49,3	± 4,3	20,1	66,6	± 2,0	67,4	73,8	± 7,6
Aree industriali	21	57,7	55,7	± 7,0	54,7	123,9	± 14,8	78,6	161,0	± 27,6
Aree autostradali	56	80,9	82,2	± 8,9	38,7	65,2	± 3,3	126,5	166,1	± 28,1

Tabella 2  
 Distribuzione di zinco, rame e piombo lungo due sezioni verticali  
 in zone ad est ed ovest dell'agglomerato urbano (valori medi in p.p.m.)

Profondità (cm)	EST			Profondità (cm)	OVEST		
	Zn	Cu	Pb		Zn	Cu	Pb
0-10	19	20	25	0-10	32	7	37
10-30	5	8	5	10-20	8	2	3
30-60	12	2	4	20-30	II	2	2
				30-40	II	< I	2

nienza, ma anche dimostrare a quali livelli può arrivare il suo accumulo nel suolo e confermare l'origine, or mai bene individuata, nei gas di scarico dei motori a scoppio. Valori, infatti, dell'ordine di 365, 620,750, 1330 p.p.m. di piombo sono stati accertati in campioni prelevati ai bordi dell'autostrada Napoli-Pompei nei pressi del casello di entrata ove il traffico automobilistico, caratterizzato da elevata congestione, ha raggiunto nel 1973 una media annuale e una punta massima, nel periodo estivo, rispettivamente di 17.545 e 22.160 veicoli al giorno (+).

La distribuzione del contenuto in zinco risulta più uniforme nelle diverse aree considerate. L'accertamento di più elevata quantità di zinco in profondità lungo i profili studiati conferma la maggiore mobilità di questo elemento.

La presenza di zinco, di rame e , in particolare, di piombo riscontrata in misura notevole nel suolo dell'area napoletana, pur non costituendo ancora di per sé un rischio, dal momento che le caratteristiche del suolo stesso sembrano attenuarne o annullarne gli effetti tossici per i vegetali, sta ad indicare però, indirettamente, pericoli potenziali da non sottovalutare (15, 17,18).

Se si considera, infatti, che nel periodo estivo lo aumento della temperatura ambiente e le scarse precipitazioni agiscono da fattori che favoriscono la dispersione degli effluenti provenienti dalle fonti di inquinamento, risulta evidente che allora aumentano i pericoli di accumulo nei vegetali instaurandosi le condizioni perchè sulle superfici fogliari possano depositarsi quantità sensibili di questi elementi (6,10).

La valutazione del contenuto in zinco, rame e piombo nei vegetali, in particolare in quelli destinati all'alimentazione, costituisce la finalità delle indagini che si stanno attualmente conducendo.

-----

(+) Dati forniti dalla Società Autostrade Meridionali-NA

BIBLIOGRAFIA

- 1) Beavington F. (1973) - Aust. J. Soil Res. II, 27.
- 2) Bottini O. (1940) - Ann. Fac. Sci. Agr. Portici II, 105.
- 3) Buondonno C. (1963) - Ann. Fac. Sci. Agr. Portici 29, 221.
- 4) Buondonno C. (1966) - Agrochimica 10, 157.
- 5) Burkitt A. et al. (1972) - Nature 238, 327.
- 6) Cannon H.L. et al. (1962) - Science 137, 765.
- 7) Ganye T.J. et al. (1972) - Califor. Agricol. 26, 4, 7, 9.
- 8) Goodman G.T. et al. (1971) - Nature 231, 287.
- 9) Lee J.A. (1972) - Nature 238, 165.
- 10) Marten G.C. et al. (1966) - Agr. J. 58, 553.
- 11) Miesch A.T. et al. (1972) - Air pollution Contr. Off. (V.S.) AP GI, 65.
- 12) Purves D. (1966) - Nature 210, 1077.
- 13) Purves D. (1967) - Plant and Soil 26, 380.
- 14) Quinche J.P. et al. (1969) - Phytopath. Z. 66, 259.
- 15) Ruhling et al. (1968) - Bot. Not. 121, 321.
- 16) Sapetti C. et al. (1973) - Agrochimica 17, 540.
- 17) Somers E. (1974) - J. Food Sci. 39, 215.
- 18) Warren H.V. et al. (1971) - Can. Mining Metallurg. Bull. 7, I.



ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI UN MICRORGANISMO CA-  
PACE DI DEGRADARE LA PROMETRINA.

M.C. GIARDINA

Laboratorio di Radiobiochimica ed Ecofisiologia Vegetali  
del C.N.R.

Le metiltio-s-triazine, data la loro attività sulle foglie, vengono usate come erbicidi post-emergenza; tra le metiltio-s-triazine la prometrina mostra di essere la più polivalente, potendo agire su un gran numero di piante; inoltre può essere usata oltre che da sola, anche associata ad alcune cloro-s-triazine (simazina e atrazina).

Problema posto dalla sua vastità di impiego, la prometrina sembra scarsamente degradabile, anche se i dati in letteratura non sono concordanti.

Quindi per meglio comprendere i contrastanti risultati è opportuno studiare il comportamento dell'erbicida in presenza di batteri capaci di degradarlo.

È stato isolato da culture di arricchimento contenenti 45 mg % di prometrina un batterio, capace di utilizzare la prometrina (2-metiltio-4,6 bis, isopropilammina-s-triazina) come unica fonte di C e N.

Dopo 5 trasferimenti su liquido fresco, venivano fatte le piastre sul seguente terreno:  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O g 0.2, NaCl g 0.2, CaCl<sub>2</sub> g 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> g 0.16,  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> g 0.64, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O mg 2.5, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> mg 2.5, CuSO<sub>4</sub>  
5H<sub>2</sub>O mg 0.1, Mn SO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O mg 0.7, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O mg 1.2, contene-  
nenti 15 g% di agar e 40 mg% di prometrina.

Le singole colonie, prelevate con ago sterile, erano purificate con successive piastrazioni.

Il batterio ottenuto è stato classificato sulla base delle sue caratteristiche morfologiche e fisiologiche, usando i tests proposti da Baird-Parker (1965), come appartenente alla specie Sarcina.

E' Gram +, con cocchi di dimensioni di circa 1,5  $\mu$  disposti a gruppi di 4 o 8 cellule, é catalasi +, benzidina +, fosfatasi +.

Le colonie, su brodo, sono convesse, a contorno intero, non pigmentate; non é stata osservata alcuna fluorescenza su terreno di King - Ward + Raney.

Su acqua peptonata cresce sul fondo del tubo lasciando limpida la parte superiore.

E' anaerobio facoltativo, mantenendo la caratteristica struttura a tetradi anche in condizioni di stretta anaerobiosi.

La crescita su glucosio é di tipo ossidativo ed aerobico, il mannitolo invece non viene utilizzato; é inoltre MR - e VP.-

Il batterio non produce modifiche sul litmus milk e non é in grado di utilizzare il citrato di Na come unica fonte di C.

I nitrati vengono ridotti a nitriti nei primi tre giorni di crescita, e successivamente degradati ad ammoniaca; produce ammonio da peptone e arginina.

Il contenuto di guanina + citosina del DNA, estratto secondo le tecniche di Marmur (1961), é stato determinato usando il metodo di denaturazione termica proposto da Marmur et al. (1961). Il %GC risulta essere 74.

#### Materiali e metodi

Il terreno di cultura usato per la degradazione della prometrina, era la soluzione minerale precedentemente descritta, con l'aggiunta di 45 mg % di prometrina.

Sulle cellule centrifugate allevate su tale terreno veniva eseguito il dosaggio delle proteine secondo il metodo di Lowry et al. (1951).

L'erbicida estratto a temperatura ambiente con cloroformio e portato a secco era dosato spettrofotometricamente intorno a 220 nm, zona di massimo assorbimento per le s-triazine e identificato per mezzo di cromatografia su

strato sottile.

A tale scopo erano usate lastrine di gel di silice di 0,25 mm, contenenti un indicatore per la fluorescenza (F254); l'eluente usato era toluolo: acetone (85:15) e lo sviluppo avveniva con o-tolidina secondo Koudela (1970).

### Risultati

Al fine di studiare le condizioni che favoriscono una più rapida degradazione della prometrina particolare attenzione è stata rivolta alle richieste funzionali e alle esigenze ambientali del batterio.

Un primo esame ha riguardato l'effetto di nitrati e del glucosio su detta degradazione; tali sostanze venivano aggiunte al terreno minerale in proporzione di 1%.

Prendendo come parametro di crescita batterica la quantità di proteine formatesi si è notato che la presenza dei nitrati ha un effetto positivo aumentando considerevolmente la produzione delle proteine mentre l'aggiunta di una fonte di C non porta alcuna differenza (v. fig. 1).

Al 9° giorno di crescita, in corrispondenza del massimo della crescita batterica, si ha la comparsa di un metabolita che presenta il massimo assorbimento a 207 nm ed ha come  $R_f=0.90$  in confronto alla prometrina che ha come  $R_f=0.60$ .

Tale sostanza scompare rapidamente nei giorni successivi, probabilmente metabolizzata dai batteri.

Ripetendo la prova, inoculando grandi quantità di cellule provenienti da un terreno ricco privo di erbicida, viene riconfermata l'influenza positiva della fonte di N e l'influenza nulla della fonte di C.

Ciò porta a dei valori proteici notevolmente più alti (vedere fig. 1) lasciando inalterato il meccanismo di attacco della prometrina, anche se accelerandolo nel tempo.

Infatti la comparsa del metabolita con assorbimento a 207 nm ed  $R_f=0.90$ , coincidente con il massimo della crescita batterica avviene al 6° giorno di crescita.

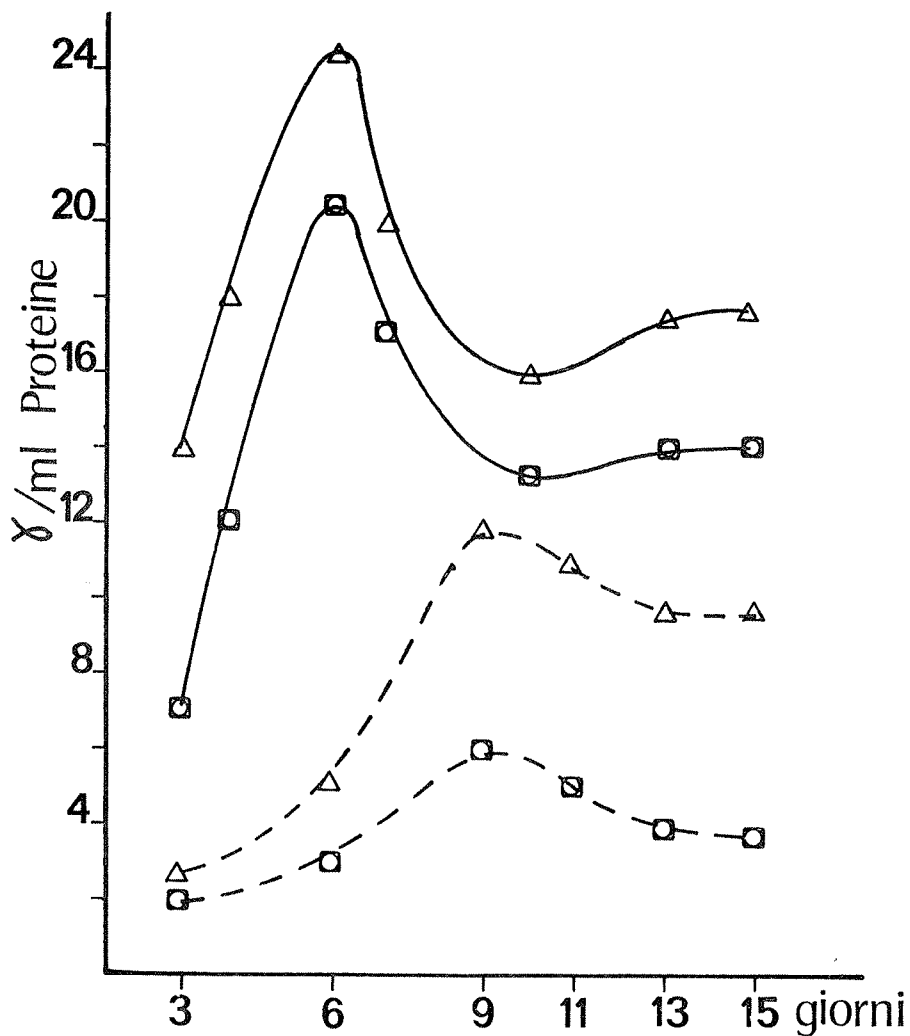


Fig. 1 - Produzione di proteina da Sarcina proveniente da terreno culturale minerale (—) o da brodo di carne (—) in condizioni di anaerobiosi in presenza di:

- △-△ Prometrina + nitrato ammonico
- Prometrina + glucosio
- Prometrina

Il più rapido attacco dell'erbicida potrebbe far pensare che il sistema enzimatico interessato alla degradazione sia di tipo costitutivo più che di tipo adattativo.

La diminuzione di proteine sul centrifugato che avviene dopo il 6° o il 9° giorno di crescita, a seconda della provenienza delle cellule, è dovuta alla lisi delle cellule batteriche, chiaramente evidenzia-  
bili all'esame microscopico.

Una possibile spiegazione potrebbe essere data dal la comparsa di un metabolita, non evidenziabile con i metodi di indagine usati, fortemente tossico nei confronti della Sarcina.

#### Bibliografia

- Baird - Parker, A.C (1963) J.gen. Microbiol 30, 409  
Koudela, S. (1970) J.Chromatogr 53, 589  
Lowry, O.H., Rosebrouch, N.J. Farr A.L and Randall R.J.  
(1951) J. Biol. Chem. 193  
Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 208  
Marmur, J., and P. Doty (1961) J.Mol. Biol. 3, 585.

MECCANISMI DI ACCUMULO DI ERBICIDI S-TRIAZINICI DA PARTE  
DI ALCUNE FRAZIONI ORGANICHE DEL TERRENO.

C. TESTINI

ISTITUTO DI CHIMICA AGRARIA DELL'UNIVERSITA' DEGLI STUDI  
DI SASSARI

I fenomeni di accumulo ai quali gli erbicidi, o i prodotti della loro decomposizione, possono andare incontro nel terreno, costituiscono uno dei temi più attuali della Chimica Agraria.

I composti in questione, infatti, possono rimanere nel terreno sia a livelli fitotossici sia a livelli non fitotossici. Nel primo caso essi possono arrecare seri danni alle piante che andranno successivamente ad insediarsi sul terreno diserbato; nel secondo caso, invece, venendo assorbiti dalle specie vegetali presenti, essi giungeranno prima o poi ad interessare le catene alimentari.

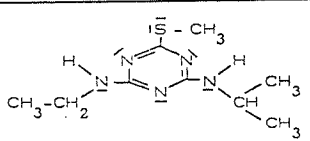
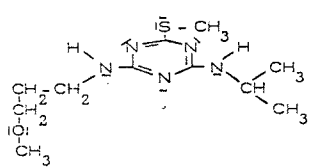
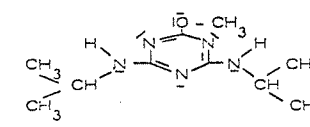
La possibilità che delle colture vengano seriamente danneggiate o addirittura distrutte, per azione residua di prodotti ad attività erbicida è molto meno remota di quanto comunemente non si pensi: si può verificare, infatti, il caso che gli erbicidi, interagendo con altri antiparassitari, mettano in atto una attività fitotossica sinergica, così come si può verificare anche che, in seguito a tali interazioni, abbia luogo un prolungamento dei tempi di persistenza nel terreno (Kearney, et al., 1969).

Fondamentale risulta, pertanto, la conoscenza dei rapporti che si stabiliscono fra erbicidi e terreno e dei fattori che tali rapporti regolano e condizionano. Sotto que

sto profilo assume particolare significato il ruolo svolto dalla sostanza organica: numerose esperienze hanno dimostrato, infatti, che all'aumentare del contenuto in sostanza organica nel terreno aumentano corrispondentemente anche le quantità di prodotto necessarie per ottenere un determinato effetto erbicida (Abel, 1957; Burnside et al., 1961; Sheets et al., 1962; Sheets et al., 1963; Upchurch, 1962). Ciò sarebbe dovuto all'elevato potere assorbente della sostanza organica nei confronti degli erbicidi (Bayley et al., 1964; Harris et al., 1964), riportabile probabilmente a meccanismi di diverso tipo quali, per esempio, forze di Van der Waals (Bayley et al., 1964), reazioni nucleofile o elettrofile (Ward et al., 1966), o ancora formazione di legami idrogeno (Armstrong et al., 1967; Armstrong et al., 1968; Sullivan et al., 1968). Il fatto che diversi Autori abbiano indicato ora l'uno o l'altro meccanismo, come responsabile degli assorbimenti, costituisce, forse, il segno più evidente della mancanza di notizie certe circa l'andamento dei fenomeni in questione, e giustifica ogni indagine avente lo scopo di ottenere dati utili per l'identificazione dei meccanismi che determinano l'immobilizzazione degli erbicidi da parte della frazione organica del terreno.

Le ricerche di cui si dà notizia in questa sede (Testini et al., 1974) furono condotte utilizzando tre prodotti ad attività erbicida (technical grade), costituiti rispettivamente da ametrina (2-metiltio-4-etilammino-6-isopropilammino-s-triazina), metoprotrina (2-metiltio-4-etilammino-6-n-etossipropilammino-s-triazina) e prometon (2-metossi-4,6-bis-isopropilammino-s-triazina). La scelta di tali composti - le cui caratteristiche sono riportate nella tabella n. 1 - fu operata tenendo conto

Tabella n. 1 - Struttura e proprietà fisiche delle triazine studiate

Denominazione comune	Denominazione chimica	Formule di struttura	Solubilità (ppm)		pK	Punto di fusione (C°)	Tensione di vapore mmHg	Momento dipolare (Debye)
			Acqua	Solventi organici				
Ametrina	2-metil-4-etilammino-6-isopropilammino-s-triazina		193	molto solubile	3,12	84 - 85	8,4 - 10	3,1
Metoprotrina	2-metil-4-isopropilammino-6-γ-metossipropilammino-s-triazina		320	molto solubile	3,03	68 - 70		
Prometone	2-metossi-4,6-bis-isopropilammino-5-triazina		750	molto solubile	4,30	91 - 92	2,3 - 10	2,9



delle differenze di complessità sterica dei diversi gruppi di sostituzione all'azoto amminico.

Le frazioni organiche utilizzate per l'indagine furono ottenute da una terra bruna della Sardegna, attraverso una particolare estrazione condotta in Soxhlet, in atmosfera di azoto ed a pressione ridotta, tramite l'impiego successivo di 10 solventi organici blandi di diversa polarità i quali agirono grazie alla presenza di ossigeno o di azoto con doppietti elettronici non condivisi (Schaffer et al., 1960). I solventi utilizzati erano, nell'ordine di impiego: 1) etere etilico; 2) benzene; 3) acetone; 4) diossano; 5) tetraidrofurano (TIF); 6) alcol etilico; 7) dimetilformammide (DMF); 8) piridina; 9) dimetilsofossido (DMSO); 10) formammide.

L'impiego della spettrometria IR permise di studiare le caratteristiche strutturali delle frazioni organiche estratte, di identificare i loro gruppi funzionali e di giungere alle seguenti conclusioni:

Lungo tutta la sequenza di estrazione si avevano variazioni caratteristiche le quali mettevano in evidenza che le prime due frazioni, costituite presumibilmente da grassi, cere e resine, avevano un netto carattere alifatico. Nelle ultime frazioni della serie era evidente, invece, uno stato di elevata ciclizzazione e condensazione fra anelli, con ponti ai quali partecipavano atomi di ossigeno, zolfo e azoto oltre che brevi catene alifatiche (Jackson et al., 1972). Le frazioni più ricche di gruppi funzionali reattivi erano quelle intermedie, rappresentate dagli estratti con diossano, TIF ed etanolo. I primi termini della sequenza di estrazione presentavano infatti prevalentemente gruppi alifatici eteri ed esteri e gruppi alcolici, mentre gli ultimi erano caratterizzati prevalentemente da gruppi chetonici coniugati e chinoni-

ci, oltre che da gruppi fenolici e carbossilici aromatici.

Lo studio delle interazioni fra gli erbicidi e le frazioni organiche di cui sopra veniva condotto nel seguente modo: tre aliquote da 15 mg di ognuna di tali frazioni, venivano tenute in contatto, per tre giorni, con tre aliquote da 100 ml di soluzioni acquose contenenti rispettivamente 15 mg di ognuno dei tre erbicidi considerati. Il sistema veniva agitato saltuariamente con agitatore meccanico ed al termine di tale periodo il liquido supernatante veniva eliminato per centrifugazione; l'intero trattamento veniva ripetuto altre due volte, procedendo, infine, per tre volte consecutive, al lavaggio con acqua distillata. Dopo essiccazione sotto vuoto spinto a 40°C le frazioni organiche sottoposte a trattamento, venivano nuovamente studiate in IR, previa dispersione in nujol ed in esaclorobutadiene. L'elevata solubilità in acqua degli erbicidi prescelti consentiva l'eliminazione completa delle aliquote di tali prodotti eventualmente presenti in eccesso; la scarsissima solubilità in acqua delle frazioni organiche permetteva, d'altro canto, di considerare trascurabili le perdite per lisciviazione a loro carico.

In base ai risultati ottenuti era possibile giungere alle seguenti conclusioni:

Le varie frazioni organiche estratte presentavano una differente attitudine ad assorbire erbicidi s-triazinici; lo studio degli spettri permetteva di ritenere che l'entità dei fenomeni di assorbimento era condizionata dalle caratteristiche steriche delle stesse frazioni e dal numero e dalla natura dei gruppi funzionali presenti. Le frazioni che davano luogo ai più intensi fenomeni di

assorbimento erano quelle estratte con etanolo, TIF e diossano, che potevano essere considerate molto simili ad acidi fulvici di notevole reattività e ad acidi imatomelanici (Lisanti et al., 1973). Tale comportamento poteva essere riportato alla presenza sia di gruppi carbossilici e fenolici, capaci di stabilire legami di tipo ionico con gli erbicidi triazinici, sia di chetoni coniugati e chinoni, impegnati in forti legami idrogeno (Gwo-Chen Li et al., 1972; McGlamery et al., 1966; Sullivan et al., 1968; Turski et al., 1971). Meno reattive delle precedenti apparivano le frazioni estratte con DMF, piridina, DMSO e formammide, considerate simili agli acidi umici ed alle umine (Lisanti et al., 1973). Esse, infatti, risultavano meno ricche di gruppi funzionali e caratterizzati in genere da un nucleo aromatico più condensato e più complesso, che rendeva indisponibile per le triazine parte dei siti reattivi del polimero (Gwo-Chen Li et al., 1972). Tali frazioni dopo il trattamento, presentavano tuttavia variazioni tali negli spettri da far ritenere possibile la formazione sia di legami ionici con le triazine sia di legami idrogeno. Le frazioni che certamente risultavano meno impegnate erano quelle non umiche le quali, per il loro carattere prevalentemente alifatico, erano caratterizzate soprattutto da gruppi funzionali prevalentemente non reattivi, eteri ed esteri. Ciò significa che esse potevano stabilire con gli erbicidi soltanto deboli legami idrogeno o interazioni del tipo dipolo-dipolo.

L'unica frazione che risultava priva di qualsiasi attitudine a formare legami con le triazine era quella acetonica.

I fenomeni di immobilizzazione a carico delle triazine studiate, determinate dalle diverse frazioni organiche,

erano possibili grazie alla presenza, nella molecola delle triazine stesse, di quattro diversi siti attivi (Hayes, 1970; Jackson et al., 1972):

- azoto amminico e azoto dell'anello triazinico, che potevano dar luogo sia a legami ionici, in seguito a protonazione operata da ioni idrogeno provenienti dai gruppi carbossilici e fanolici delle frazioni organiche, sia a legami idrogeno con le stesse frazioni organiche;
- ossigeno del gruppo metossi- ed eventualmente zolfo del gruppo metiltio- in posizione 1, che potevano dar luogo a ponti con l'idrogeno delle diverse frazioni organiche;
- idrogeno presente sotto qualsiasi forma nella molecola triazinica, che poteva impegnare atomi molto elettronegativi, presenti nelle diverse frazioni organiche.

Le singole triazine venivano immobilizzate da parte delle diverse frazioni organiche, essenzialmente in funzione della complessità sterica dei gruppi di sostituzione all'azoto amminico. L'ametrina e la metoprotrina, infatti, che sono simili in tali gruppi sostituenti, risultavano assorbite pressappoco nella stessa misura, mentre il prometone, a causa dei due gruppi isopropilici presenti risultava meno facilmente assorbibile (Sheets, 1970). Non influenzato da tale fattore sterico risultava l'assorbimento a carico delle frazioni estratte con DMF, piridina, DMSO e formammide. A conferma di quanto già osservato da altri Autori (Bayley et al., 1964; Gwo-Chen Li et al., 1972; Leopold, 1956; Leopold et al., 1960; Sheets et al., 1962; Wolf et al., 1958) i dati ottenuti dimostravano poi che, nell'ambito della stessa famiglia di erbicidi, l'entità dei fenomeni di immobilizzazione risultava tanto maggiore quanto più bassa era la solubilità de-

gli erbicidi stessi.

I dati ottenuti nel corso dell'indagine si qui illustrate, fornendo informazioni circa la natura dei legami che si potevano stabilire fra le varie frazioni organiche e gli erbicidi studiati possono avere esclusivamente significato qualitativo. Solo successive indagini potranno fornire quindi notizie circa l'intensità dei legami in questione.

#### BIBLIOGRAFIA

- Abel A.L. (1957). Chem. Ind. 1106
- Armstrong D.E., Chesters G., Harris R.F. (1967). Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 31, 61
- Armstrong D.E., Chesters G. (1968). Environmental Sci. and Techn. 2, 683
- Bayley G.W., White J.L. (1964). J. Agr. Food Chem. 12, 324
- Burnside O.D., Behrens R. (1961). Weeds 9, 145
- Gwo-Chen Li, Felbeck jr. G.T. (1972). Soil Sci. 113, 140
- Harris C.J., Warren G.F. (1964). Weeds 12, 120
- Hayes M.H.B., Stacey M.J., Thompson M. (1966). In "Isotopes and radiation in soil organic matter studies". Proc. Symp. FAO/IEA, 75, Vienna
- Hayes M.H.B. (1970). Residue Rev. 32, 131
- Jackson M.L., Swift R.S., Posner A.M., Knox J.R. (1972). Soil Sci. 114, 75

- Kearney P.C., Helling C.S. (1969). Residue Rev. 25, 25
- Leopold A.C. (1956). Proc.N.Central Weed Control Conf. 13, 4
- Leopold A.C., Schaik P., van Neal P. (1960). Weeds 8, 48
- Lisanti L.E., Testini C., Senesi N., Polemio M. (1973). Agrochimica 17, 282
- McGlamery M.D., Slife F.W. (1966). Weeds 14, 237
- Scheffer F., Ziechmann W., Pawelke G. (1960). Z. Pflanz. Bodenk. 90, 58
- Sheets T.J., Crafts A.S., Drever H.R. (1962). J.Agr. Food Chem. 10, 458
- Sheets T.J., Shaw W.C. (1963). Weeds 11, 15
- Sheets T.J. (1970). Residue Rev. 32, 287
- Sullivan J.D.jr., Felbeck G.T.jr. (1968). Soil Sci. 106, 42
- Testini C., Senesi N., Solinas V. Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari (In corso di stampa)
- Testini C., Senesi N., Solinas V. Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari (In corso di stampa)
- Turski R., Steinbrich A. (1971). Pol. J. Soil Sci. 4, 119
- Upchurch R.P., Mason D.D. (1962). Weeds 10, 9
- Ward J.M., Holly K. (1966). J. Colloid Interface Sci. 22, 221
- Wolf D.E., Johson R.S., Hill G.D., Warner R.W. (1958). Proc. N. Central Weed Control Conf. 15, 7

## INDICE

Comitato Organizzatore . . . . .	Pag. 2
Elenco dei partecipanti. . . . .	" 3
Saluto del Presidente della Società Italiana della Scienza del Suolo. . . . .	" 7

## RELAZIONI

L.GOLDBERG FEDERICO - Aspetti chimici dell'inquina- mento del suolo. . . . .	Pag. 9
G. PICCI - Aspetti microbiologici dell'inquinamen to dell'ambiente da mercurio e suoi composti	" 71

## COMUNICAZIONI

W. BALLONI, R. MATERASSI, G. FLORENZANO - Implica zioni ecologiche delle concimazioni: eutrofiz zazione dell'ambiente e scompensi nel ciclo dell'azoto. . . . .	Pag.95
R. CANDUSSIO, M. VISINTINI ROMANIN - Il passaggio di fosforo e di azoto a corpi d'acqua "agrari" superficiali dai terreni e dai sedimenti di fondo. . . . .	" 105
G. BAGGI, D. CATELANI, A. COLOMBI, E. GALLI - Ul teriori ricerche sulla degradazione microbica degli alchilbenzensolfonati. . . . .	" 127
G. BAGGI, E. GALLI, C. SCOLASTICO, V. TRECCANI - Sulla degradazione microbica di alcuni tensio attivi non ionici. . . . .	" 131
L. ANNICCHIARICO SEBASTIANI, G. TARSITANI, A.D'AR CA SIMONETTI - Riflessi igienici della contami	

nazione del suolo da parte di detergenti sintetici e di un erbicida. . . . .	Pag. 135
N. ROSSI - Effetti dei principi attivi di alcuni detersivi sulla germinabilità e sulla crescita di piante erbacee. . . . .	" 147
S. MIELE, G.P. VANNOZZI - Atrazina, simazina, terbutrina e alacloro nel diserbo del mais. Studio della fitotossicità residua. . . . .	" 167
A. LUZZATI - Effetto di tensioattivi su alcune specie vegetali. . . . .	" 169
G. BASILE, F. PALMIERI, P. VIOLANTE - Inquinamento da zinco, rame e piombo nel suolo dell'area urbana ed industriale di Napoli. . . . .	" 177
M.C. GIARDINA - Isolamento e caratterizzazione di un microrganismo capace di degradare la prometrina. . . . .	" 183
C. TESTINI - Meccanismi di accumulo di erbicidi s-triazinici da parte di alcune frazioni organiche del terreno. . . . .	" 189
Indice. . . . .	" 199



La stessa superficie radicale, denominata rizoplano (Clark, 1949), è un particolare substrato organico e vivo, che viene colonizzato dai microrganismi. Quindi il concetto di microflora del rizoplano diventa più stretto e un tutto essenziale con la radice. Se è possibile esprimere la popolazione microbica della rizosfera in rapporto ad 1 g di terra, quella del rizoplano dovrebbe essere più correttamente indicata per g di radice o cm<sup>2</sup> di superficie radicale.

Si realizzano in tal modo nicchie particolari che nella più intensiva manifestazione diventano mantelli microbici, cui il fattore dominante è rappresentato dai prodotti dell'apparato radicale comprendenti sostanza organica, essudati e metaboliti vari che consentono livelli di densità ed attività microbiche nettamente superiori a quelle che si verificano ordinariamente nel suolo.

Dal punto di vista agronomico e selvicolturale la rizosfera si differenzia a seconda che le radici crescano in suoli coltivati o naturali.

Nei primi dovrebbe essere tenuto presente, come rilevano Rovira e McDougall (1967), che la massima parte del suolo a colture foraggere o a moderne colture agrarie è da considerare rizosfera.

Nei suoli naturali la entità della sostanza organica ipogea, il carattere perennante della vegetazione erbacea o arborea, e la quantità di radici morte o moribonde implicano processi, direttamente collegati ad una umificazione rizosferica, nella quale frazioni fenoliche liberate dalla decomposizione della lignina, da residui flavonoidi o da prodotti del metabolismo microbico possono polimerizzare, incorporare aminoacidi ed altri costituenti presenti al momento della condensazione o copolimerizzare acidi fenolici freschi. Inoltre la penetrazione delle radici negli strati più profondi del suolo e la decomposizione di esse in zone di terreno di solito scarsamente popolate da microrganismi pongono problemi sui quali non si è ancora rivolta l'attenzione degli studiosi (Van der Drift, 1970).

Le caratteristiche essenziali della rizosfera come biotopo sono una specie di effetto stimolante continuato sulla microflora, mentre il terreno circostante è un sistema relativamente statico, ed una massiva attività microbica.

Questi due caratteri hanno importanti implicazioni microbiologiche, fisiologiche e biochimiche.

È noto che l'aggiunta di residui organici freschi o di semplici composti, come il glucosio, si traduce nell'attivazione della decomposizione di una parte della sostanza organica nativa del suolo e produce il cosiddetto « priming effect » (Jansson, 1960; Macura, Szolnoki e Vancura,

1963). Piccole frequenti aggiunte di materiali a base di carbonio determinano una decomposizione della materia organica più intensa delle grandi e meno frequenti somministrazioni. La rizosfera realizza appunto questo tipo di rifornimento nutritivo.

Katznelson (1965) attribuì alla microflora rizosferica prima di tutto un'azione di massa, paragonabile ad una analoga azione della microflora



Una veduta dell'Aula Magna Storica dell'Ateneo Pisano durante i lavori del Colloquio.

tellurica che disponga di materiale energetico, come la sostanza organica. Tuttavia da tale semplice punto di vista quantitativo esiste già una differenza che si esprime con l'indice R/S, in media pari a 25-30 con limiti da 2 a 200, il che significa che l'azione di massa della microflora rizosferica supera largamente, per densità e biomassa, quella della microflora tellurica.

Ma la differenza essenziale sta nel carattere di continuità della attività microbica nella rizosfera, specie a livello di rizopiano, in contrapposizione con la discontinua, episodica ed irregolare attività della microflora tellurica.

Il terreno, come è noto dagli indici globali di misura dell'attività biologica, presenta tassi respiratori i quali, anche se non correlati con il numero e la biomassa microbica, sono inferiori del 25-35% a quelli della rizosfera. La CO<sub>2</sub> prodotta dalle radici varia dal 30 al 50% della quantità totale e molta della CO<sub>2</sub> si origina non solo dalle radici, ma anche dall'azione microbica sugli essudati radicali.

Molte sono le cause di inattività microbica nel terreno: fenomeni di dormienza, di quiescenza da sfavorevoli fattori fisici o chimici dell'ambiente, starvazione per mancanza o scarsità di sorgenti energetiche, fattori di inibizione diversi, tra i quali il fenomeno immanente di « generalizzata micostasi » (Lingappa e Lockwood, 1961) o di « micostasi residua » (Dobbs e Dash, 1965).

Le ricerche più recenti tendono ad interpretare la fungistasi come risultato della starvazione.

I fatti invocati per spiegare la fungistasi sono probabilmente di molto più ampio rilievo ed interessano tutta la popolazione microbica del suolo.

La situazione nutritiva del terreno è paragonabile più ad una coltura continua a nutrizione limitante, che ad una coltura discontinua.

In esperimenti di laboratorio in chemiostato, Righelato e coll. (1968) dimostrarono che *Penicillium chrysogenum* richiede « razioni » sia per la crescita, sia per il mantenimento: a livello nutritivo di mantenimento si verificano nelle cellule modificazioni morfologiche e chimiche; a 1,7 volte le esigenze di mantenimento, la produzione di conidi è maggiore. La induzione di strutture dormienti per abbassamento del livello nutritivo è stata pure dimostrata nelle alghe verdi-azzurre (Wolk, 1965) e nei batteri (Harrison e Lawrence, 1963; Mandelstam, 1969).

Così è stato dimostrato che in coltura, la sintesi di nuove proteine è possibile in condizioni di starvazione (Pardee, 1961). Inoltre le sostanze di riserva ricche di energia, formate durante la crescita attiva (es. acido poli-β-idrossibutirrico, glicogeno), possono pure fornire energia.

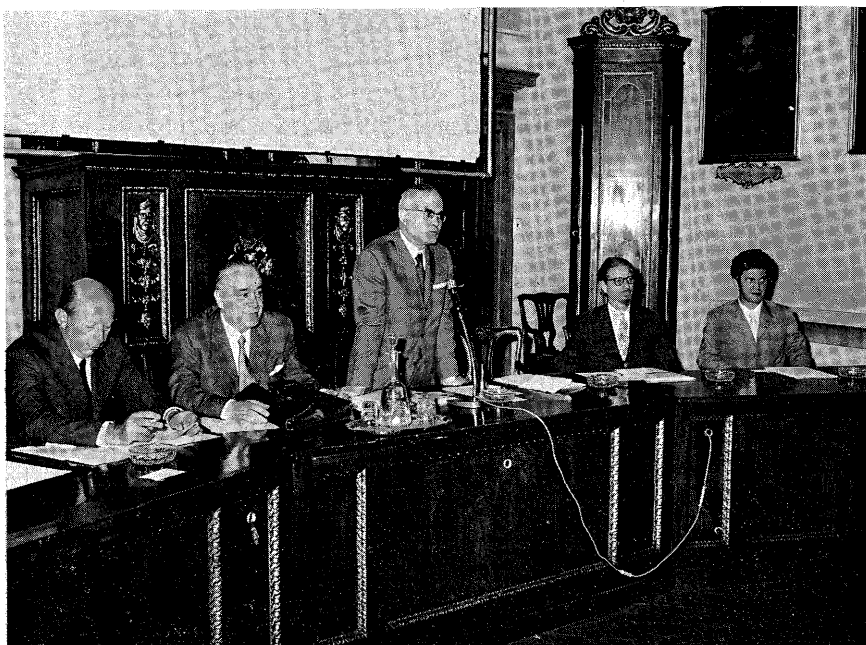
Se tutto ciò si verifica nel terreno, la rizosfera rappresenta al contrario un microhabitat attivo e dal punto di vista nutritivo relativamente pletorico.

La radice provvede, in un sistema povero e statico, come il suolo, un benefico rifornimento nutritivo, di relativamente lungo termine ed una stimolazione dell'attività microbica nella rizosfera, almeno analoga, grosso modo, alla stimolazione di spore in vicinanza di residui organici freschi, aggiunti al terreno.

La microscopia diretta di superfici radicali rivela la presenza di ife

fungine, più pronunziate nelle parti vecchie della radice con tessuti esterni moribondi (Parkinson, 1967). La colonizzazione fungina delle radici avviene per successivo, laterale accrescimento dal terreno adiacente (Taylor e Parkinson, 1961). Per gli attinomiceti e batteri la loro presenza sulle radici era già stata dimostrata da Starkey nel 1938.

Rovira (1956) sulla superficie radicale rilevò batteri crescenti sia in colonie (da pochi a centinaia di individui), sia in forma più diffusa, ma



Il Prof. Florenzano presenta il Prof. Arthur Douglas Mc Laren del Department of Soils and Plant Nutrition della Università di California.

le osservazioni più interessanti si devono a Jenny e Grossenbacher (1963), che rilevarono al microscopio elettronico le colonie batteriche, immerse nello strato di mucogel che circonda le radici.

Questa intima associazione fra batteri ed apparato radicale, specialmente peli radicali, a livello del rizopiano, pone il problema se il ruolo dei microrganismi nell'assorbimento nutritivo non sia più diretto di quanto fino ad ora si sia pensato. La possibilità di discriminare il ruolo fisiologico dei batteri da quello della radice è complicato proprio dalla intima connessione fra i due partner, ma il fatto che le conoscenze

sulla struttura della associazione radicale si va arricchendo di nuovi elementi porta a rivedere anche le idee sui suoi aspetti fisiologici.

Occorre meglio chiarire se lo stadio della microflora della rizosfera e del rizopiano è di sopravvivenza o di riposo sul sistema radicale o è una popolazione continuamente cangiata con vari gruppi che prevalgono o soccombono a seconda delle condizioni.

Le ricerche hanno dimostrato valida questa ultima concezione oltre all'esistenza di differenti meccanismi di colonizzazione microbica delle radici.

Escludendo le associazioni simbiotiche fra radici e funghi nelle micorrize ecto ed endotrofiche e fra leguminose e rizobi, la rizosfera diventa così una zona ben definita del terreno, con un gradiente microbiologico, che raggiunge il massimo effetto delle radici nel terreno più vicino ad esse ed in corrispondenza del quale si ha il picco dell'attività fisiologica della popolazione microbica.

Lo studio del comportamento dei microrganismi rizosferici non può essere pertanto distinto da quello dell'attività delle radici, che forniscono il substrato di crescita ai microrganismi.

Le radici possono liberare nel suolo una grande varietà di composti solubili (Barber, 1969) e la loro superficie, specialmente l'apice, la caliptra, è circondata da sostanza simile a gelatina.

Leiser (1968) ha pubblicato fotografie nelle quali il diametro dell'astuccio gelatinoso raggiunge circa il doppio di quello delle zone apicali su radici sottili di ericacee.

Non si può ancora dire come queste sostanze ed i microrganismi che in esse si annidano modificano l'ambiente in stretta vicinanza con la superficie radicale e come influenzino il passaggio degli elementi nutritivi nelle radici. In questo risiede la difficoltà di stabilire il ruolo dei peli radicali: il terreno che essi possono esplorare presenta intensa attività microbica e la dimostrazione che gli elementi nutritivi entrano rapidamente nella pianta da questa zona è compatibile sia con il ruolo dei peli radicali, sia con la rizosfera che può avere una funzione significativa.

Inoltre sembra possibile che gli effetti dei peli radicali non possano essere distinti in modo ben netto da quelli dei microrganismi.

Dart e Mercer (1914), lavorando con piantine di leguminose inoculate con *Rhizobium*, osservarono che lo strato di mucogel, incluso in una membrana esterna, contiene ed è colonizzato dai batteri simbiotici che si dispongono in strati di 8 cellule. Questa concentrazione (con indici R/S = 3-10.000) nella matrice gelatinosa viene spiegata dagli AA. come necessaria per la sintesi di auxina e la induzione della poligalattu-

ronasi, condizioni per l'infezione dei peli radicali. La essudazione di questo ultimo enzima si manifesta soltanto in presenza di rizobi infettivi (Nutman, 1963) e dimostra la stretta connessione tra microrganismi della rizosfera e processi di essudazione.

Il mucogel perciò è considerato come « tessuto esterno » piuttosto che vago strato che s'immerge nel suolo senza discontinuità. Ma questa non è più rizosfera, che è il terreno adiacente alla radice, ma rizopiano nel senso di Jenny e Grossenbacher (1963), cioè di entità tridimensionale per la presenza simultanea delle anfrattuosità radicali, peli radicali e microcolonie batteriche. Sebbene i rizobi si trovino in strati di più cellule sulla superficie radicale, è probabile che su molte radici in natura i batteri non siano disposti in più strati di cellule, ma colonizzino in modo sparso. Le cellule non si mescolano intimamente con il mucogel e, quando ciò avviene, segue la lisi dei rizobi.

L'ecologia della rizosfera appare in definitiva la più complessa degli habitat del suolo, in quanto le interazioni interne, dirette ed indirette, della pianta (essudazione radicale, distacco e morte dei tessuti, modificazione della composizione della fase gassosa, assunzione di macromolecole per pinocitosi, etc.) controllano le attività microbiche che modificano a loro volta la permeabilità delle cellule radicali, il metabolismo delle radici e la natura chimica dei loro prodotti di essudazione.

In un siffatto ecosistema risiedono l'intimo meccanismo della produttività delle piante, i centri di continua attività biologica del suolo ed il livello al quale si riflettono tutti i fattori ecologici, edafici e metabolici di una coltura che esplora con parecchie tonnellate di radici per ha il terreno (nel caso della medica si calcolano una lunghezza totale di 10.000 Km e una superficie di contatto pari a 7.000 m<sup>2</sup> per ogni ha di prato).

#### LA RADICE COME SUBSTRATO NUTRITIVO

Presupposto fondamentale per comprendere l'effetto rizosfera sono la fisiologia radicale e la biochimica degli essudati radicali, fattori dominanti del fenomeno.

Il metabolismo respiratorio, la composizione delle radici come substrato nutritivo per i microrganismi, i cambiamenti in alcune specifiche proprietà dei sistemi radicali sotto l'influenza di variabili condizioni esterne, la resistenza della radice alla invasione microbica, la capacità della pianta a sopportare mutilazioni del sistema radicale, qualora queste si verificano, sono tutti aspetti della complessa interazione radici-microrganismi.

Tutti i fattori citati attendono dai fisiologi delle piante maggiori chiarimenti.

Si deve aggiungere che le relazioni biochimiche tra radici della pianta e microrganismi del suolo sono di fatto, oltre che un aspetto fisiologico, un problema ecologico perché interessa la fisiologia che si manifesta in un certo ambiente naturale.

Le giovani radici contengono praticamente ogni sorta di composti organici, prodotti dalla pianta, ai quali si aggiungono gli elementi minerali assunti direttamente dal suolo.

Nonostante che le radici dipendano dalle foglie per le sorgenti di carbonio e di energia, le estremità radicali non vivono in penuria di carboidrati. Viene riportato da Burström (1965) un contenuto in zuccheri solubili pari al 2% del peso secco, ma sono possibili anche valori più elevati, in funzione dello stadio di crescita e del tasso di consumo. Sono frequenti depositi di amido, specie nelle cellule centrali della caliptra e nel parenchima corticale, il che dimostra un ampio rifornimento di carboidrati.

Il contenuto di azoto organico risulta più costante e, per quanto riguarda l'azoto proteico, piuttosto elevato (8% nel meristema; 4% circa nelle parti mature; Brown e coll. 1952).

In conclusione le radici possono essere considerate substrato a rapporto proteine-carboidrati nettamente alto, relativamente alle altre parti della pianta (foglie con il 2-3% di proteine sul secco) e più basso relativamente ai batteri ed ai funghi.

Anche la composizione in sali minerali delle radici presenta speciali caratteristiche. Esperimenti in colture acquatiche con il mais hanno fornito i seguenti rapporti tra contenuto in elementi minerali delle radici rispetto a quello delle foglie, espressi in peso secco: N 1,0; S 1,0; P 0,5; K 0,3; Mg 0,8 Ca 1,3; Mn 2,0 e Fe 7,3. Gli elementi relativamente abbondanti nelle radici, sono lentamente traslocati nella pianta e si riscontrano nelle radici basse concentrazioni di P e K; anche di B, ma relativamente elevate quantità di Ca e di metalli pesanti con alto rapporto Ca : K.

I dati medi non forniscono ragguagli sulla distribuzione degli elementi nutritivi nei tessuti e nelle cellule e sulla dinamica della nutrizione radicale che ha maggiore importanza dei contenuti assoluti per la microflora, specie per quella patogena o simbiote che vive entro le cellule o negli spazi intercellulari, siti che devono avere condizioni nutritive ben differenti.

Tra le fonti dei costituenti radicali, oltre al suolo, che fornisce i

sali minerali e le foglie che forniscono alcuni composti organici, si deve considerare la stessa capacità di sintesi radicale.

Il potere di sintesi della radice non è meno importante per l'effetto rizosfera delle altre fonti di costituenti radicali. Un primo aspetto di tale capacità è la costante formazione di protoclorofilla da parte delle estremità radicali crescenti nel suolo (Hejnowicz, 1958) proprio come germogli etiolati, ed è necessaria solo la luce perché le radici sviluppino regolari cloroplasti e svolgano attività fotosintetica (Fadeel, 1963).

Le radici inoltre dipendono dalle foglie per il rifornimento dei componenti essenziali di natura ormonica che non possono essere formati in situ.

D'altro canto la radice assorbe prontamente l'N sotto forma nitrica dal suolo, lo assimila in forma organica e sintetizza essa stessa proteine, per cui nelle piante vi è un reciproco scambio di elementi nutritivi e di componenti tra parte epigea ed ipogea.

Il sistema radicale è ovviamente la principale via di assimilazione di azoto inorganico, che procede in stretta connessione con l'assorbimento (Burström, 1945).

Le conoscenze sul potere di sintesi dei metaboliti secondari da parte delle radici sono molto scarse ed indirette in quanto ricavate da esperimenti condotti su radici recise. In tali condizioni le radici mancano più o meno completamente della capacità di sintesi dei metaboliti essenziali e possono, se ne è dedotto, formare tutti gli altri composti (enzimi, attivatori, etc.), necessari al normale sviluppo.

Le radici recise, sviluppate su mezzi artificiali sono, secondo Street (1959), quasi sempre eterotrofe per una o più vitamine (tiamina, niacina o piridossina); mancano della capacità di formare triptofano (Ferguson, 1963), importante sia per la sintesi delle proteine, sia come sostanza madre delle indol-auxine. Si è ammesso che la medesima eterotrofia vitaminica si verifichi nelle radici di piante intatte. Non si sa se nelle radici si verifichi una naturale deficienza vitaminica, ma non è detto che possa avvenire. Né si conoscono le differenze esistenti tra le radici nell'habitat naturale e le radici recise, sotto differenti condizioni nutritive, ma è noto che la deficienza di composti ormonali può essere indotta con mezzi artificiali quali la defoliazione e l'aduggiamento (Richardson, 1957).

I composti non sono stati identificati, ma siccome sono necessari per la crescita, sono considerati appartenenti al gruppo generico delle rizocaline. Questo aspetto della fisiologia radicale interessa la microflora rizosferica, in quanto batteri e funghi auxotrofi necessitano dei medesimi



fattori accessori di crescita delle radici, con la differenza che tali composti fungono da vitamine per i microrganismi e da ormoni per le piante superiori. Solo con la conoscenza dei fatti fin qui accennati si può affrontare lo studio dei meccanismi con i quali le piante stimolano elettivamente i microrganismi. Prevalgono però gli studi descrittivi su quelli diretti alla ricerca dei fattori fondamentali che operano intorno e sulle radici.

Occorre conoscere il bilancio energetico della rizosfera ed indagare quanti essudati, cellule desquamate, cellule morte o moribonde contribuiscono alla nutrizione microbica. Si considerano solo bilanci energetici, catene alimentari, piramidi produttive e si dimenticano prodotti secondari del metabolismo (fenoli, alcaloidi, terpeni) che hanno significato ecologico e che concorrono alle relazioni chimiche piante-microrganismi, in quanto tali sostanze possono assumere speciale importanza per la microflora, perché fisiologicamente attive, dato che le radici producono e contengono una grande varietà di tali composti, anche se soltanto un numero limitato di essi sia stato studiato in rapporto alla localizzazione della sintesi, al reale contenuto delle radici e agli effetti fitotossici.

Le radici intatte e sane emettono o essudano materiali organici sufficienti a sostenere una densa flora microbica.

Secondo Balandreau e coll. (1971) la produzione di essudati, che per Vancura (1964) ammonta al 7-10% della sostanza secca della parte aerea della pianta, in climi temperati può raggiungere i 250 Kg/ha.

Una rassegna della letteratura (oltre 100 lavori) rileva un ampio spettro di composti negli essudati delle radici intatte. Essi comprendono zuccheri, aminoacidi, peptidi, enzimi, vitamine, acidi organici, principi stimolanti o attrattivi di funghi, inibitori fungini, inibitori ed attrattivi di nematodi.

L'importanza di tali essudati fu discussa da Schroth e Hildebrand (1964) in relazione ai patogeni del suolo e da Rovira (1965, 1970) in relazione ai microrganismi del suolo e quindi si rimanda a tali rassegne.

La quantità degli essudati condiziona la densità della microflora rizosferica, le differenze qualitative ne determinano la specificità.

Rovira (1956) determinò la quantità di residui radicali su 50 piante di pisello e 50 di avena, cresciute su sabbia, ed ottenne i seguenti residui radicali (in mg)

dopo gg.	Pisello	Avena
10	16,7	6,6
21	31,5	14,8

Meshkov (1953) riscontrò che il pisello in soluzione nutritiva essudava in 20 gg mg 2,9 e 4,3 di zuccheri riducenti per pianta (pari allo 0,14 e 0,23% in peso secco) ed il mais mg 8,4 e 8,2 mg per pianta pari allo 0,23 - 0,35% sul secco.

Rivière (1960) riportò che una singola pianta di grano in coltura axenica produceva 13 mg di acido acetico, 3,5 di propionico, 2 di butirrico e 1,5 di valerico fino allo stadio di accestimento.

Harmsen e Jager (1963) su un suolo sintetico (70% sabbia, 25% felspato e 5% caolinite), che più si avvicina all'ambiente naturale, dimostrano che la veccia essuda per pianta composti di carbonio equivalenti a 1,6-2,9% del carbonio della radice durante la crescita di 2 mesi.

Vancura e Hocadik (1965) confrontarono su 6 piante diverse aminoacidi, zuccheri ed acidi organici essudati e dimostrarono che grano ed orzo presentano spettri simili, ma differenti da quelli del pomodoro e peperone rosso, che sono fra loro simili. Cetriolo, rapa e cavolo hanno ciascuno un distinto spettro, Tra grano ed orzo, la differenza consiste nella presenza nel primo di acido  $\gamma$ -aminobutirrico, sufficiente da solo a determinare differenze qualitative e quantitative nella microflora del rizopiano e della rizosfera.

Ma è valido prevedere il significato degli essudati radicali in relazione alla microflora della rizosfera dai risultati ottenuti con piante cresciute in condizioni sterili?

A tale obiezione si deve aggiungere che la essudazione di specifiche sostanze bioattive (stimolanti o inibitrici), per le quantità infinitesime che vengono elaborate, scende al disotto dei limiti di sensibilità degli ordinari metodi di indagine chimica e cromatografica e richiede specifici biosaggi o la produzione massiva di essudati radicali.

In effetti hanno una grande influenza sulla quantità e qualità di essudati la specie vegetale, la sua età, la temperatura, la luce, la nutrizione ed altri fattori ecologici, dai quali non si può prescindere se si vuole tracciare un quadro aderente alla realtà.

Il ruolo dei microrganismi come promotori dell'essudazione è molteplice e può consistere nell'alterazione della permeabilità delle cellule della radice, nella modificazione del metabolismo radicale e nell'assimilazione ed alterazione di molte sostanze essudate.

È dimostrato che le radici non sterili secernono più aminoacidi, più enzimi e determinano un maggior contenuto di clorofilla nella parte aerea (Rempe e Kaltagova, 1965).

Gli effetti dei microrganismi rizosferici sullo sviluppo radicale, sul-

la composizione del succo radicale, sull'assorbimento di cationi ed anioni e sullo sviluppo fisiologico delle colture sono pure ben netti anche se non sufficientemente noti.

#### SPECIFICITA' DELL'EFFETTO RIZOSFERA

Le considerazioni precedenti dimostrano un altro carattere fondamentale delle relazioni rizosferiche, la specificità risultante da un duplice ordine di fatti, connessi da una parte con la specie di pianta ed il suo abito metabolico e da un'altra con il tipo di microflora e le sue molteplici attività fisiologiche e biochimiche.

Lo studio degli essudati rappresenta il primo corollario diretto e definitivo per la comprensione dei fattori che influenzano le attività microbiche e per chiarire in quale misura specifici microrganismi siano influenzati dagli essudati radicali.

Un secondo corollario è la variazione della microflora rizosferica da una pianta all'altra. Se si esclude l'ampia generalizzazione, in parte documentata, che le leguminose come gruppo presentano nella loro rizosfera la più densa popolazione microbica rispetto alle non-leguminose, non si può allo stato attuale catalogare le microflore rizosferiche delle differenti piante, né si può stabilire in che misura i sistemi radicali, i tassi di crescita, i differenti gradi di essudazione in funzione di temperatura, luce, umidità o di altre variabili agiscano sulla specificità delle microflore associate alle radici.

Con modelli gnotobiotici, di rizosfere artificiali si possono osservare fenomeni vicini alla manifestazione dell'effetto rizosfera in natura.

La rizosfera infine non deve essere considerata soltanto come la regione, nella quale si possono formare sostanze benefiche per le piante, ma anche la regione nella quale sostanze inibitrici dello sviluppo vegetale possono essere distrutte o accumularsi.

Per quanto riguarda la composizione della microflora, Rovira e Brisbane (1966) trovarono che su 300 colture batteriche isolate dal suolo e da rizosfera di grano e di trifoglio, vi era una stretta correlazione fra capacità delle colture a colonizzare densamente la rizosfera e le seguenti caratteristiche: Gram-negatività, pleomorfismo, bastoncini ramificati; rapida crescita su glucosio, responso ai supplementi di aminoacidi, produzione di  $\text{NH}_3$  da peptone, produzione di acidi da glucosio, responso positivo al test della arginina, sensibilità al cloramfenicolo e resistenza all'eritromicina e penicillina.

La predominanza dei batteri Gram - nella rizosfera, quale risulta da numerose ricerche, non è soltanto una notazione morfologica, ma riveste significato fisiologico, se si considerano le differenze tra Gram + e Gram —.

I caratteri, che distinguono i Gram —, sono la maggiore suscettibilità agli enzimi proteolitici, l'alto pH, il comportamento alle azidi, al tellurito, agli agenti ossidanti e la lisi ad opera del complemento, mentre i Gram + sono più suscettibili agli acidi, ai detergenti, agli alchil-solfati, solventi organici, iodio.

Inoltre si ha una differente composizione chimica delle pareti cellulari, che nei Gram — contengono aminoacidi aromatici, assenti nei Gram +, meno esosamina (3-5%; nei Gram + 10-20%) e più lipidi 15-20%; nei Gram +, 2-4%).

Quindi la reale causa del comportamento al Gram risiede nella differente composizione della parete e del protoplasma cellulari e nella differente natura della cellula di un positivo e negativo.

I bastoncini Gram — comprendono 3 gruppi, gommogeni o non:  
*I gruppo ossidativo*: A — non gommogeno, con i generi *Pseudomonas* che produce pigmenti giallo-verdi e verdi e ha ciglia polari; *Xanthomonas*, che comprende anche fitopatogeni riferiti al vecchio genere *Phytopomonas*, ed *Acetobacter*. Tra i minori generi, le specie che attaccano particolari substrati: *Protaminobacter* che attacca alchilamina e *Micoplana* i fenoli; B — gommogeno: *Azotobacter* e *Rhizobium*; tra i non fissatori *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium* (pigmento violetto), *Flavobacterium* (giallo) *Achromobacter*, *Agarbacterium*, *Benekea*.  
*II. Gruppo fermentativo*: comprende agenti di avvizzimento e di marciumi molli del genere *Erwinia*; i cromogeni del gen. *Serratia*; *Aërobacter*, con tipi simili ad *Escherichia*, ma associati ad habitat naturali, e *Klebsiella* correlato ad *Aërobacter*, differenziato da capsula e nelle più recenti ricerche tra i generi fissatori più interessanti.

Tra i non fermentanti e fluidificanti la gelatina va ricordato il gen. *Proteus*.

Un altro gruppo di Gram —, quasi orfani, trascurando i patogeni *Pasteurella*, *Brucella*, *Haemophilus*, etc., è quello che comprende *Bacteroides* e *Fusobacterium*.

Tra i cocchi Gram —, a parte *Neisseria*, *Veillonella* comprende anaerobi obbligati non patogeni.

*III gruppo*: bastoncini ricurvi ed a spirale, tra i quali si ricordano *Cellvibrio*, *Desulfovibrio* e *Spirillum*.

In generale nella rizosfera sono favoriti *Agrobacterium radiobacter*,

le spp. dei generi *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Achromobacter* ed *Alcaligenes*. È ben dimostrato che i Gram — sono elettivamente stimolati nella rizosfera (Starkey, 1958; Tardieux e coll. 1960; Macura e Vancura, 1965).

Al contrario rappresentanti del gen. *Bacillus* sono meno numerosi, come quelli del gen. *Arthrobacter*, che in taluni casi si dimostra però il maggior componente della popolazione rizosferica (Sperber e Rovira, 1959; Katznelson e Siroi 1961, Jagnow 1961).

Nei riguardi di *Azotobacter* si hanno, in funzione delle diverse piante, assenza, stimolazione o inibizione dei batteri di questo gruppo. Gli attinomiceti sono rappresentati da spp. di *Streptomyces* (*S. lavendulae*, *S. ruber*, *S. griseus*) e non di *Micromonospora*.

È prematuro comunque un censimento dei generi di batteri propri della rizosfera, perché i dati della letteratura sono ancora insufficienti.

Per i protozoi, specie predatori di batteri, si ha un certo parallelismo tra aumento della densità batterica ed incremento del numero di protozoi, il che non sorprende se si considera che certe specie sono particolarmente eduli per certi protozoi.

Più interessanti per il carattere di specificità della microflora rizosferica, sono le distinzioni fisiologiche.

Prima Lochhead e Chase (1943) distinsero 7 gruppi nutrizionali, che Taylor (1951) modificò riducendo a 5 e più tardi Katznelson e coll. (1956) limitarono a 3. I microrganismi che sviluppano in un mezzo base contenente glucosio e sali inorganici appartengono al primo gruppo, mentre nel secondo si comprendono quelli esigenti aminoacidi, nel terzo quelli che hanno bisogno di estratto di lievito ed estratto di terra.

Con tali metodi di differenziazione fisiologica, fu pressoché generalmente riscontrato che nella rizosfera si ha elettiva incidenza di batteri che hanno bisogno per la crescita di aminoacidi, vitamine e fattori di crescita.

Si stabilisce così un nesso stretto tra la natura dei materiali prodotti o essudati dalle radici, in funzione dell'età, la varietà, specie, stato nutritivo, condizioni di crescita delle piante ed esigenze fisiologiche dei microrganismi.

Anche nei riguardi degli altri gruppi microbici si hanno correlazioni strette. La microflora è stimolata nella rizosfera, nella quale si riscontrano popolazioni fungine più volte maggiori di quelle del suolo, senza considerare le relazioni micorriziche. Come Garrett sottolinea, la microflora oltre i funghi dello zucchero e della lignina, rispettivamente a *Penicillium* e a Basidiomicetico pattern (Burges, 1960), comprende i

« funghi delle radici » che, oltre a parassiti facoltativi polifagi o specifici, si distinguono in simbionti caratterizzati da fisiologia ed ecologia particolari.

Parkinson e coll. (1963) hanno osservato che i funghi sono distribuiti lungo le radici in modo disforme; l'apice radicale è pressoché privo, la zona retrostante contiene colonizzatori non specifici, mentre le parti più vecchie ospitano funghi più specializzati (*Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon radicum*, *Gliocladium spp.*, *Trichoderma viride* e miceli sterili).

Dalla rizosfera del grano coltivato in suoli alcalini si isolano come specie dominanti rappresentanti del gen. *Mortierella*, mentre in suoli acidi predominano *Trichoderma* e *Penicillium*.

Le alghe sono, secondo Katznelson (1956) e Starkey (1958) poco o affatto implicate nell'effetto rizosfera.

Cullimore e Woodbine (1963) riferiscono per la prima volta, documentandolo, un effetto rizosfera delle radici di pisello sulle alghe del suolo. Tuttavia il lavoro di tali AA. condotto su colture gnotobiotiche, alla superficie di un mezzo minerale agarizzato, non permette di affermare che gli stessi fatti si verifichino per le radici crescenti nel suolo in presenza di una microflora mista.

Le ricerche condotte su leguminose e graminacee dai nostri collaboratori nel terreno indicano un effetto rizosfera delle alghe nel suolo ben netto e confermano i ripetuti reperti di Shtina in Russia. Analogamente in terreni di vivaio ed in idroponica si rilevano fatti simili (Balloni e coll., 1972).

I batteri esigenti di aminoacidi della rizosfera sintetizzano tiamina, riboflavina, biotina, vitamina B<sub>12</sub>, il che spiega perché molti batteri, che hanno bisogno di vitamine, si trovino nella rizosfera, nonostante che gli essudati radicali siano deficienti di vitamine del gruppo B.

Lo stesso vale per il triptofano, così importante nella sintesi delle indol-auxine, che non è presente negli essudati radicali e lo è invece nella composizione aminoacidica dei batteri Gram —.

I gruppi fisiologici ed ecologici più importanti del ciclo dell'azoto presentano anch'essi caratteri specifici nella rizosfera.

Per gli azotofissatori, a parte la segnalazione di Döbereiner dell'*Azotobacter paspali*, tipico azotofissatore rizosferico, le ricerche recenti, in virtù del test dell'acetilene, che permette rapidi ed esaurienti indagini su ceppi e su campioni di rizosfera (Rinaudo e Dommergues, 1971; Paoletti, Materassi, Favilli, Florenzano, 1972) e dell'uso dei tubi di Pankhurst (1966) per gli anaerobi, fanno presumere che nella rizosfera ab-

biano un ruolo ecologico maggiore gli azotofissatori liberi anaerobi del gen. *Clostridium* oppure anaerobi facoltativi del gen. *Klebsiella*, importanti nella fissazione fillosferica e considerati una volta dubbi fissatori, nonché *Bacillus polymyxa*, che fissano soltanto in anaerobiosi; rappresentanti del gen. *Pseudomonas*, con attitudini fissatrici come le nostre varietà di « *fluorescens* », « *indologenes* » e « *vallis-umbrosae* » (Florenzano e coll., 1966). La stessa presenza di batteri del gen. *Pseudomonas* nella micoclena delle radici di *Pinus radiata* rappresenta la spiegazione della controversa attività azotofissatrice della micorrizza di questa pianta (Rambelli).

Così pure i rappresentanti mesofili del gen. *Desulfotomaculum*, dei quali lascia presumere la presenza nella rizosfera la riscontrata riduzione dei solfati (Dommergues, 1969) in determinate condizioni pedologiche, sono tutti capaci di azotofissazione anaerobia (Postgate, 1971). Gli stessi discordanti rapporti sulla colonizzazione di *Azotobacter* nella rizosfera devono essere riveduti alla luce del rilevato adattamento e della possibilità di selezione di ceppi dalle rizosfere nelle quali i batteri devono operare.

Né si può escludere un ruolo in eterotrofia delle alghe verdi-azzurre eterocistate (Tomaselli e Florenzano, 1970) alcune delle quali contraggono addirittura simbiosi radicali.

Dei *Rhizobium* va sottolineata la loro intensa colonizzazione della rizosfera delle leguminose, esorbitante le esigenze della simbiosi, la stimolazione che i batteri subiscono dalle radici di tutte le piante e la capacità di sintesi di sostanze bioattive, quali la B<sub>2</sub> e la B<sub>12</sub> (Shemakhnova e Sidorenko, 1970; Ricci e Balloni, 1972).

Per gli ammonizzanti la più elevata proporzione di questo gruppo (indice R/S superiore a 50: Katznelson e coll., 1956) nella rizosfera è in grado di assicurare una rapida degradazione degli aminoacidi, ma l'ammonizzazione netta è bassa, perché regolata dal rapporto C/N degli esudati, di solito intorno a 16, e dalla immobilizzazione da parte della stessa pianta e della microflora rizosferica.

Tuttavia l'immobilizzazione è in parte un corto circuito in cui l'azoto reso disponibile viene assimilato man mano che si produce (Bremner, 1968).

La rizosfera è meno favorevole ai nitrificanti, tanto che Goring e Clark (1948) dimostrarono che vi era meno azoto assimilabile nella rizosfera di quello che sarebbe stato trasformato in nitrato se il terreno fosse stato incolto.

Tuttavia se la maggior parte delle radici delle piante saggiate non

inibiscono *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, altre addirittura stimolano la loro moltiplicazione nella rizosfera (Katznelson, 1946; Molina e Rovira, 1964; Rivière, 1960). Anzi una medesima pianta, ad età differenti, esercita effetti contrastanti sui nitrificanti.

I denitrificanti rappresentano un gruppo molto numeroso nella rizosfera (Katznelson e coll. 1956) ed anche un indice, come oggi generalmente si ammette, della fertilità del terreno. Le ricerche di Woldendorp (1962, 1963) a Wageningen dimostrarono che dal 15 al 37% dei fertilizzanti nitrici somministrati ad un prato permanente viene volatilizzato e le perdite sono doppie di quelle conseguenti all'impiego di ammoniacali.

Vi interviene il metabolismo gassoso delle radici, che consumano molto più ossigeno, abbassandone il livello al punto da favorire la denitrificazione, ma anche l'azione stimolante degli essudati radicali e di composti che servono da donatori di idrogeno per i denitrificanti.

Del resto l'esperienza di Kruglov (1960), citata da Verona (1969), dell'inoculazione, in coltura idroponica di mais, di *Pseudomonas melochlora* dimostra che l'azione dei batteri denitrificanti è legata nei suoi effetti alla natura del fertilizzante azotato che s'impiega.

Concludendo, la microflora rizosferica nei gruppi fisiologici che la compongono riconferma un carattere di specificità ben evidente per l'azione elettiva a livello delle radici, che a loro volta determinano in funzione della specie e varietà di pianta un equilibrio microbiologico quali-quantitativo altrettanto specifico.

La popolazione microbica della rizosfera non solo deve essere considerata differente da quella tellurica (forse la sierologia ed immunologia permetteranno di stabilire affinità ed incompatibilità di tipo umorale ed istogeno con le radici) ma anche da quella decomponente dei residui organici.

#### INTERAZIONI MICROBICHE NELLA RIZOSFERA

L'aver considerato gli aspetti essenziali delle interazioni nella rizosfera tra piante e microrganismi nel senso reversibile di effetto della pianta sui microrganismi e di questi sulla pianta ci ha implicitamente dato la possibilità di sottolineare le interazioni microbiche sinergiche o antagonistiche che a livello radicale s'instaurano in modo attivo e dinamico.

Le sinergie si riassumono nella complementarità dei gruppi fisiolo-



gici di microrganismi a differenti esigenze, in simbiosi biochimiche, in metabiosi, in associazioni mutualistiche, che possono coincidere con il benessere della pianta, ma non è detto che non risultino dannose qualora si stabilizzino microflora fitotossiche o si turbi l'equilibrio microbiologico della rizosfera.

Gli antagonismi, nel senso ugualmente ampio del termine, sono in generale alla base della competizione tra i microrganismi attraverso predazione, parassitismo, produzione di antibiotici, di tossine, di sfavorevoli condizioni ambientali.

Il più piccolo predatore che si conosce, *Bdellovibrio bacteriovorus*, è considerato da Stolp e Starr (1963) « predatore, ectoparassita e batteriolitico » e si riscontra nei terreni coltivati (Corberi e Solaro, 1972) ma è interessante stabilire se può trovare ospiti fra i microrganismi rizosferici. Un primo dato interessante è la resistenza di *Rhizobium* al suo attacco.

La predazione dei funghi per azione litica o micolisi si può specificamente definire micofagia. Mentre è controversa ancora la esistenza di una micolisi da virus, si hanno fenomeni ben noti di micofagia ad opera di altri microrganismi e degli stessi funghi verso i funghi.

L'azione micolitica degli attinomiceti avviene a distanza dal micelio e non richiede stretta vicinanza con le ife, a differenza della lisi batterica dei funghi. Ciò può essere dimostrato in agar-culture sulla base degli aloni di dissoluzione delle ife fungine circostanti colonie di *Streptomyces*.

La chitina è un substrato elettivo per lo sviluppo nel suolo di attinomiceti micolitici. Vari batteri sono capaci di produrre enzimi extracellulari che producono lisi di altri batteri, funghi e protozoi.

I batteri che utilizzano come nutrimento funghi o loro costituenti cellulari sono micoparassiti micolitici. Numerosi casi di parassitismo si verificano nei funghi ad opera di altri funghi secondo due tipi di micofagia, designati da Barnett (1963) come necrotrofia e biotrofia.

Questi fatti possono anche essi riuscire favorevoli o dannosi per la pianta, nella cui rizosfera si svolgono.

#### PROSPETTIVE DI CONTROLLO DELL'EFFETTO RIZOSFERA

I progressi compiuti nelle conoscenze sull'effetto rizosfera hanno indubbiamente aperto nuove possibilità alla comprensione di un meccanismo fondamentale del processo produttivo delle colture ed hanno for-

nito una base scientifica per approfondire e sviluppare l'analisi dei processi microbiologici che intervengono nello sviluppo e produttività delle piante.

Le prospettive di applicazione dei risultati delle ricerche sono molte, ma quelle più interessanti e sicure sono poche, anche se tutte dimostrano che si può modificare l'equilibrio microbiologico della rizosfera a favore di microrganismi utili, conseguendo risultati agronomicamente interessanti.

Una rapida rassegna dei tentativi compiuti è la migliore prova delle attuali limitate possibilità, ma anche di promettenti prospettive.

La pratica della fertilizzazione, le applicazioni fogliari di concimi, di metalli chelati, fungicidi, antibiotici, erbicidi, possono tutti influenzare, talora profondamente, la microflora rizosferica.

L'influenza della natura del terreno sull'effetto rizosfera è purtroppo poco studiata ma è certo che la reazione a fertilizzanti ed alle altre pratiche agronomiche sarà differente da suolo a suolo. I suoli poveri in elementi fertilizzanti, ad equilibrio biologico instabile, hanno un indice R/S nettamente più elevato dei suoli ricchi di riserve minerali e ad equilibrio biologico stabile. La reazione ai fertilizzanti è conseguentemente differente. Così Katznelson nel 1946 da esperimenti condotti su barbabietola coltivata in terreni concimati e non concimati concluse che l'effetto rizosfera è il medesimo nei due casi, benché nel secondo caso risulti più tardivo.

Balloni e Materassi (1966), operando con piante di lino e di pisello in vasi di terreno sabbioso e povero, addizionato o meno di concimi chimici (nitrato di sodio, solfato ammonico, fosfato monopotassico, soli o associati) oppure organici, hanno dimostrato che tutti i trattamenti stimolano la microflora rizosferica, ma in generale meno della microflora del suolo, ciò che porta ad una diminuzione del rapporto R/S, soprattutto importante nel caso dei concimi organici.

I microelementi stessi costituiscono un importante fattore della nutrizione nella rizosfera, che diventa frequentemente sede di attiva competizione nutritiva, soprattutto a causa del prevalere di determinate microflora. Da questo punto di vista le esigenze delle piante, specie in rapporto alla carenza di microelementi, sono state poco studiate. Le esperienze di Sadavisan (1965) hanno dimostrato una stimolazione rizosferica per somministrazione di Mn, Zn e B su cotone. Effetti drammatici, anche se di breve durata, sulle popolazioni rizosferiche, sono conseguenti alle applicazioni fogliari di elementi minerali (chelati di Mn, Mo, Zn, e B) che stimolano la microflora, ma la stimolazione relativa di specifici

componenti (batteri, attinomiceti e funghi) differisce con l'elemento (Van Schreven, 1959; Vransy e coll., 1962). Se ciò avvenga perché si fornisce un elemento essenziale al metabolismo della pianta o perché si altera il suo metabolismo con incremento del tasso di essudazione radicale e quindi della popolazione rizosferica, non è ancora noto.

Le applicazioni fogliari di composti nutritivi, antibiotici, fungicidi, erbicidi e regolatori di crescita agiscono direttamente, migliorando la nutrizione e lo stato fitosanitario della pianta ed indirettamente modificando la composizione della microflora rizosferica.

L'applicazione dell'urea è stata studiata da vari AA. con risultati talora contraddittori, che non devono sorprendere se si considerano le tecniche differenti e l'epoca delle indagini, nonché la diversa attitudine ad utilizzare l'urea delle piante prese in esame. Venkataraman (1960) ottenne nella rizosfera di *Camelia sinensis* una stimolazione preferenziale dei batteri ed una inibizione dei funghi; al contrario Ramachatra - Reddy (1959) per il riso riscontrò aumento di *Penicillium* e diminuzione di batteri ed attinomiceti; Agnibotri (1964) su grano, osservò una netta modificazione della composizione chimica degli essudati, con un aumento straordinario di glutamina e aminoacidi, specie acido  $\gamma$ -aminobutirrico, di glucosio e fruttosio e diminuzione di acidi organici. Vransy (1965) riscontrò nel grano sensibili variazioni quali-quantitative dell'equilibrio rizosferico e Horst ed Herr (1962) per il mais proliferazione di attinomiceti antagonisti di *Fusarium roseum*.

Fatti analogamente contraddittori, sono stati rilevati, in base ai riferimenti bibliografici disponibili, per antibiotici, per fungicidi, fitormoni, erbicidi. Su questi ultimi è opportuno soffermarsi per l'interesse che presenta il meccanismo diretto ed indiretto di attività dell'assorbimento fogliare sui fenomeni rizosferici.

Data la diversa sensibilità dei microrganismi del suolo agli erbicidi (i batteri aerobi sono più sensibili al 2,4-D degli anaerobi, i Gram + più dei Gram — e gli sporigeni più dei non sporigeni) è evidente che tali azioni selettive potranno ripercuotersi sull'equilibrio rizosferico, ma la natura dei cambiamenti indotti in questa zona non è facilmente prevedibile.

Gli erbicidi presentano prospettive quali regolatori indiretti della microflora rizosferica, in quanto capaci di indurre modificazioni biochimiche e fisiologiche nella pianta. Questo tipo di intervento, che presuppone l'applicazione fogliare a piccole dosi, appare in linea di principio specifico ed efficace, in quanto agisce sul fattore che direttamente controlla l'equilibrio rizosferico. Già nel 1955 Westlake notò che nella mi-

croflora rizosferica di piante di orzo irrorate con soluzioni di 2,4-D si registrava un temporaneo aumento della carica batterica.

Recentemente Sethunathan (1970) ha ripreso in esame il problema delle modificazioni dell'effetto rizosfera, indotte da applicazioni foliarie di taluni erbicidi e regolatori di crescita, cercando di correlarle con le modificazioni fisiologiche indotte nella pianta dai prodotti impiegati. Fra le osservazioni più significative di questo A. si possono citare le seguenti:

a) l'applicazione foliare di 2,4-D stimola la microflora batterica, mentre l'acido naftalenacetico stimola gli eumiceti. L'effetto stimolante è da correlare con una maggior essudazione conseguente a modifiche della permeabilità delle membrane e del metabolismo dei carboidrati con un aumento degli zuccheri solubili. Il fatto che il 2,4-D stimola i batteri e l'NAA i funghi appare più correlato con differenze nella composizione degli essudati che non con un effetto diretto dei prodotti traslocati nel suolo attraverso la pianta;

b) gibberellina ed idrazide maleica (MH) riducono la densità della popolazione microbica della rizosfera. Tale effetto viene attribuito ad una minor disponibilità di carboidrati nelle radici per il prevalere della crescita del fusto;

c) la incidenza di taluni gruppi fisiologici di microrganismi, quali gli amilolitici ed i denitrificanti, può essere sensibilmente modificata a seconda del composto somministrato per via foliare. Anche queste modificazioni trovano una spiegazione nelle variazioni del livello di glucidi e composti azotati solubili presenti nella radice.

Alla sostanza organica ipogea viene riservato un cenno a parte, per le implicazioni, a livello di rizosfera, degli effetti sulla formazione e demolizione di fitotossine. Inoltre altra sostanza organica si aggiunge per favorire lo sviluppo delle piante e per la lotta biologica di parassiti.

Alcuni componenti dei residui organici naturali che raggiungono il terreno sono rapidamente assimilati, mentre altri persistono e concorrono direttamente o indirettamente alla formazione dell'humus. Così se viene aggiunta al terreno paglia di segale marcata con  $C_{14}$ , il 60% del carbonio lascia il terreno dopo 6 mesi, ma il 20% resiste ancora dopo 4 anni (Jenkinson, 1965).

La persistenza nella rizosfera e nel suolo di alcuni costituenti delle piante e la capacità di queste di formare una grande varietà di sostanze tossiche, allelopatiche, autopatiche e microbiologicamente attive, pongono problemi che riguardano l'apporto della materia organica, l'insorgenza di

fenomeni fitotossici e talora mali più gravi (crisi da reimpianto, mancata rinnovazione di popolamenti forestali, stanchezza del terreno).

Fra i più persistenti componenti naturali sono fenoli, terpenoidi, alcaloidi, glucosidi cianogeni, che rappresentano una frazione importante del metabolismo delle piante, legata alla difesa chimica, ad un antagonismo incruento con il significato ecologico di mezzi efficaci contro potenziali nemici diffusi nell'ambiente. Un gruppo importante di tali costituenti secondari è costituito dalle fitotossine sulla cui natura, origine, composizione ed attività è stato riferito in questo colloquio (Picci, 1972).

Perciò i residui vegetali e ammendanti organici sono una arma a doppio taglio, in quanto possono favorire la microflora antagonista dei patogeni oppure nuocere alla pianta per diretta azione tossica, indirettamente favorendo l'invasione della rizosfera da parte di parassiti e la produzione di tossine. Talvolta effetti dannosi possono derivare dallo esaurimento di elementi nutritivi o di ossigeno, dalla immobilizzazione di N e P o da un eccesso di  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  ed altri gas prodotti durante la decomposizione microbica dei residui.

La teoria delle tossine nel suolo implica concetti tra i più antichi, più complessi e più controversi invocati per spiegare l'allelopatia, l'intossicazione, la stanchezza del terreno, alcuni mali della grande coltura, che si guarivano con il riposo del terreno.

Tuttavia, la natura chimica delle fitotossine e la possibilità di accumulo a concentrazioni efficaci per il manifestarsi di malattie radicali richiama il meccanismo della attività localizzata e in genere effimera degli antibiotici nel suolo, a meno che non si determinino le condizioni della monocoltura prolungata ed il ristagno delle attività biologiche.

Non vi è dubbio che le sostanze fitotossiche e, più in generale, i principi microbiologicamente attivi essudati dalle radici od originatesi nel suolo dalla degradazione di residui delle colture, hanno effetti marcati sulla popolazione della rizosfera, effetti che debbono essere compresi se si vuole definire l'origine di molti fenomeni patologici nel suolo e se si desidera ottenere, dai molti ed efficaci regolatori chimici che la natura ci offre, risultati agronomicamente utili.

La rizosfera offre gli esempi più evidenti dell'azione regolatrice esercitata sulla microflora da composti tossici. Il significato dei glucosidi cianogeni, quali amigdalina, durrina e linamarina, interessa profondamente la rizosfera delle piante che li producono, ossia il pesco, il sorgo ed il lino, poiché i cianuri organici hanno non solo effetti allelopatici ed autopatici, ma anche microbiologici. Una ormai vecchia esperienza che illumina su tali relazioni chimiche tra piante e microrganismi nella rizo-

sfera e sul loro significato ecologico si deve a Timonin (1941): con le varietà di lino Bison resistente e Novelty sensibile al *Fusarium lini*, ponendo in coltura asettica le radici delle due varietà raccolse gli estratti mediante sacchi di collodio; la varietà resistente determinò rarefazioni di funghi dovuta all'HCN liberato dalla linamarina e tale effetto fu poi riprodotto in vitro con KCN.

È noto da tempo che nella rizosfera del noce si riscontra un effetto paradossale in quanto la maggior parte della microflora è distrutta dallo juglone, fitotossina specifica di detta pianta.

Mishustin e Naoumova (1965) hanno segnalato che la saponina, esudata dalla medica, inibisce la crescita di *Bacillus malyacearum* agente della gomma del cotone, provocando una vera e propria disinfezione specifica del suolo.

La cumarina, attivo inibitore di diversi microrganismi, fra cui *Sporocytophaga*, è emessa dalle radici di *Anthoxantum odoratum* e seleziona nella rizosfera una specifica microflora decomponente (Rivière e Chaussat, 1967).

Prodotti fitotossici e microbiologicamente attivi si originano anche dai residui vegetali in via di decomposizione.

Talvolta la tossicità è conseguente alla liberazione nel suolo di sostanze preesistenti nei tessuti vegetali (acido abscissico, abscissine, etc.). Tuttavia di solito le sostanze tossiche si formano nel processo di decomposizione, specialmente nella degradazione della frazione aromatica. Börner (1960) dimostrò che estratti acquosi a freddo di paglia di orzo, segale e grano contengono acido ferulico, p-cumarico, vanillico e p-idrossibenzoico, così come molti composti intermedi del metabolismo della lignina o di altri costituenti fenolici dei vegetali, sono energici inibitori di molti microrganismi.

La fluoroglucina inibisce, fra gli altri, *Sporocytophaga*; gli acidi gallico e clorogenico sono attivi su *Azotobacter*, *Rhizobium*.

Se la produzione di principi tossici appare un fatto generale in coincidenza della decomposizione di resti vegetali, nella maggior parte dei casi essa non è accompagnata nel suolo da effetti fitotossici sulle colture successive. Non sono chiare le ragioni per cui la decomposizione di un dato residuo è seguita da formazione di fitotossine in alcuni casi e non in altri.

La comparsa di tossine è più frequente in terreni compatti, umidi e perciò asfittici. Quando manca l'ossigeno, cellulosa, lignina, proteine ed altri costituenti dei tessuti vegetali danno luogo a vari intermedi di riduzione, molti dei quali fitotossici (Patrik e Koch, 1958).

Perciò direttamente o indirettamente l'aereazione del suolo influenza piante e microrganismi e rappresenta un fattore critico che si verifica sempre a livello di microhabitat anaerobici localizzati (grumi di 3 mm. di diametro, saturi di umidità). Tanto più intensa è l'attività microbica, come avviene nei primi stadi della decomposizione, tanto maggiore, in carenza di O<sub>2</sub>, la formazione di fitotossine, come dimostra la netta inibizione della germinazione dei semi (tassi di inibizione riscontrati dopo 10-25 gg. di decomposizione da Patrik e Toussoun (1965) dal 30-70% fino al 95%).

In genere si ammette che gli effetti fitotossici (30% di inibizione) si manifestino entro il periodo richiesto perché la decomposizione raggiunga lo stadio in cui il residuo non è più riconoscibile.

Gli studi di Patrik e Koch (1958) e di Patrik e Snyder (1963) dimostrano che nella maggior parte delle condizioni pedologiche la produzione e la effettiva tossicità di prodotti in decomposizione sono per lo più limitate ai siti in cui adatti substrati sono presenti, cioè microhabitat costituiti da frammenti di residui.

Per quanto riguarda le radici, durante la crescita queste e la microflora che le accompagna vengono a contatto con frammenti di residui organici e sono favorevolmente o sfavorevolmente influenzate a seconda dei tipi di sostanze prodotte in quel particolare momento. Così l'estensione del danno radicale deriva prima di tutto dalla frequenza con cui un sistema radicale in accrescimento incontra frammenti di residui i cui prodotti di decomposizione sono tossici.

Gli effetti dannosi per le piante sono perciò localizzati e proporzionali alla quantità di residui nelle immediate vicinanze della radice.

Una eccezione si ha nel caso di abnorme quantità di residui aggiunti o lasciati nel suolo, che può condurre ad effetti fitotossici generalizzati e gravi. Non per nulla gli agricoltori realizzano con il fuoco una specie di disintossicazione.

L'attività e la natura effimera delle fitotossine si realizzano solo se sussistono determinate condizioni pedologiche e se la sostanza organica che raggiunge il terreno non ha i caratteri di materia eterogenea, grezza, ma risulti previamente elaborata e detossificata da processi microbiologici che si svolgono fuori del suolo.

Questi fatti inducono a meditare sulle conseguenze di taluni indirizzi e situazioni attuali dell'agricoltura.

## INOCULAZIONI MICROBICHE E RIZOSFERA

Una prospettiva interessante, ove si tenga conto di tutti i presupposti ecologici e microbiologici, è quella dell'inoculazione di microrganismi utili nel suolo e nella rizosfera.

I maggiori effetti conseguibili sono offrire alla pianta sostanze organiche ed inorganiche che stimolano la crescita e migliorano la qualità e la resa delle colture, proteggerle dai fitopatogeni ed eliminare sostanze fitotossiche.

Rientrano tra gli inoculati azotobatteri, fosfobatteri, silicobatteri, funghi, attinomiceti e batteri antagonisti, funghi produttori di gibberelline, alghe verdi-azzurre azotofissatrici.

Un primo problema è la disponibilità delle biomasse occorrenti alle inoculazioni.

Gli studi sulla produzione massiva di microrganismi sono stati diretti all'alimentazione animale ed umana, ma data la comune convinzione che i fertilizzanti microbici sono altamente desiderabili in agricoltura, è necessario rivolgere le indagini anche alla produzione ed utilizzazione agricola di biomasse per migliorare la resa e la produttività delle piante.

Il problema economico della produzione di siffatti fertilizzanti sarebbe facilitato dall'impiego di colture massive non sterili all'aperto o di fermentatori portatili trasportati da carrelli nelle aziende agrarie dove le biomasse potrebbero essere prodotte ed applicate immediatamente.

Il secondo problema è quello dell'applicazione di trattamenti fisici o chimici, il cui effetto primario sia quello di distruggere in parte la popolazione del suolo (microrganismi, mesofauna, radici) rendendo disponibile una notevole quantità di substrati energetici nuovi.

Secondariamente le nicchie ecologiche in precedenza occupate dai microrganismi dannosi, diventano disponibili rendendo possibile l'inseppimento in esse di inoculanti. A questa azione generale si accompagnano le seguenti:

- gli stessi agenti chimici di «sterilizzazione parziale» sono substrati utilizzabili come sorgenti di C, N, P e S in funzione della loro natura;
- solubilizzazione di cationi;
- nel caso del vapore e, in minor misura, con mezzi chimici l'alterazione della sostanza organica determina una migliore utilizzazione microbica.

In sostanza i microrganismi trovano nei suoli parzialmente steriliz-



zati non solo un « vuoto biologico » (Kreutzer, 1965) ma anche supplementi nutritivi inorganici ed organici.

Per la spiegazione degli effetti stimolanti secondari, segnalati già da tempo, basta riferirsi ad una recente esperienza di Jenkinson (1966, 1968): dopo trattamento del terreno con cloroformio, in presenza di paglia a carbonio marcato, si ha un intenso sviluppo di CO<sub>2</sub> che deriva non dalla decomposizione della paglia, ma dalle frazioni di sostanza organica preesistente e dalla biomassa uccisa dal cloroformio.

La stimolazione da trattamenti chimici è talora così importante da potersi comparare all'effetto stimolante della sostanza organica fresca. Si suppone che ciò sia il risultato della mobilizzazione dell'azoto, ma una concimazione azotata equivalente risulta meno favorevole. Anche la eliminazione dei parassiti e delle erbe infestanti non è sufficiente a spiegare il fenomeno, dato che l'effetto si manifesta anche se il suolo era sano.

Simon-Sylvestre (1967) pensa che si determini produzione di sostanze di crescita o altri composti stimolanti in conseguenza delle accresciute attività biologiche.

Nella ricolonizzazione la microflora più resistente è la prima a svilupparsi, specie se il trattamento è specifico: batteri allo stato di spore e cisti, funghi in stadio di clamidospore e sclerozi e la microflora ecologicamente protetta (nematodi nelle galle, funghi nei semi) per cui la microflora patogena non si elimina dal suolo.

Il suolo è inoltre invaso dai microrganismi presenti nelle zone vicine alla regione trattata, nei punti in cui le dosi sono state insufficienti ad una disinfezione.

Il suolo sterilizzato viene ricolonizzato a stadi successivi, non noti abbastanza e basati sulle conoscenze delle popolazioni microbiche che intervengono nella materia organica in decomposizione.

Le prime forme che invadono sono quelle favorite da un livello energetico elevato e che utilizzano zuccheri ed aminoacidi.

L'effetto selettivo si esercita sui gruppi fisiologici, nutrizionali e morfologici. I batteri sporigeni sono favoriti dal trattamento termico, dai nematocidi, dalla cloropicrina (Le Borgne, 1966). Il bromuro di metile presenta una tossicità intrinseca inferiore a quella della cloropicrina e perciò agisce soprattutto sulle spore batteriche probabilmente per il suo potere penetrante. Meno selettivo, esso crea un « vuoto » biologico e una stimolazione maggiori, ma anche squilibri più importanti (Reber, 1967).

Gli ammonizzanti sono in genere i più « favoriti », le funzioni proteolitiche ed amilolitiche si ristabiliscono dopo 15 giorni; dopo un mese

la cellulolisi anaerobia è intensa e numerosi i clostridi azotofissatori, ma non i cellulolitici aerobi (Coleno e Coll. 1965).

I nitrificanti sono sensibili e si ristabiliscono lentamente. Può avvenire che un settore della popolazione microbica sia particolarmente sensibile; trattamenti a dosi insufficienti possono minare irreversibilmente i rizobi e, secondo Vela e Wyss (1962), i fissatori liberi.

Analogamente la specificità interessa i gruppi sistematici, attinomiceti e funghi. Fra questi i primi colonizzatori sono *Trichoderma*, *Aspergillaceae* e *Chaetomium* più tolleranti della disinfezione del suolo.

Dopo applicazione di formolo, *Trichoderma* diventa dominante; dopo fumigazione con CS<sub>2</sub> a dosi moderate si verifica la stessa dominanza (Bliss, 1951) ma a dosi più energiche le *Aspergillaceae* prendono il sopravvento.

Le conoscenze sull'ecologia microbica del suolo sono il fondamento per la comprensione e l'applicazione dell'inoculazione del suolo: il successo dipende dal fatto che le nicchie ecologiche liberate siano occupate prima possibile da microrganismi favorevoli e prima del ristabilirsi di specie dannose. Allo scopo si devono impiegare inoculi massivi per esaltare le modificazioni nella proporzione di sopravvivenza (Johnson, Means e Weber, 1965; Brown e coll., 1968; Postgate e Harley, 1971).

L'impiego, dopo sterilizzazione chimica o fisica, dei simbionti della medica determina una resa maggiore della coltura, forse per la eliminazione dei ceppi di rizobi indigeni, che non entrano in competizione con quelli selezionati, o perché vengono soppressi antagonisti (Khan e coll. 1968).

Dal punto di vista agronomico, i trattamenti disinfettanti al suolo non si limitano alla riduzione del potenziale infettivo, ma rappresentano mezzi per creare nel suolo popolazioni microbiche favorevoli alla sua fertilità, eliminare prodotti fitotossici e sopprimere certe microflora (solfato-riducenti, Mn-ossidanti, denitrificanti, Fe-ossidanti), che impediscono l'assorbimento di uno o altro elemento nutritivo.

Approfondendo le conoscenze sulle relazioni tra la pianta e le popolazioni microbiche si può influire sulla composizione di queste per inoculazione e l'apporto di emendanti adatti.

L'introduzione di microrganismi nella rizosfera mediante concia microbica dei semi parte dal presupposto che sia possibile il popolamento microbico delle radici indotto dalla microflora del seme.

L'effetto rizosfera è concepito, secondo tale principio, il prolungamento, la estensione ed il perfezionamento dell'effetto seme, nel senso enunciato da Verona (1960).

I microrganismi applicati ai semi, seguono in genere lo sviluppo della pianta, migrando verso le radici, che provvedono, in un sistema nutritivo povero come il suolo, un rifornimento nutritivo benefico e prolungato.

La letteratura è ricca di segnalazioni circa l'effetto favorevole sullo sviluppo vegetale conseguente alla introduzione nella rizosfera di specie microbiche diverse dai *Rhizobium*. Tuttavia l'incostanza dei risultati e la incapacità di spiegarne la causa (attribuita, di volta in volta, alla azotofissazione, al controllo biologico di fitopatogeni o a produzione di ormoni), hanno diminuito l'interesse per le inoculazioni microbiche, con la ovvia eccezione dei simbionti delle leguminose.

Le ricerche sugli effetti della inoculazione delle piante con specie batteriche diverse dai *Rhizobium* hanno mostrato la potenziale utilità della introduzione di determinate specie microbiche nella rizosfera. I russi sono stati senza dubbio i più attivi in questo campo, giungendo ad usare su larga scala i cosiddetti « fertilizzanti batterici », costituiti in prevalenza da specie di *Azotobacter*, da *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* e da altri.

Quantunque molti dati della letteratura riguardanti gli effetti delle inoculazioni batteriche dei semi siano di scarso valore perché ottenuti in esperimenti poco rigorosi, appare ormai accertato che dalle inoculazioni batteriche dei semi ci si può attendere i seguenti effetti:

(a) incrementi nella crescita delle piante e nelle rese delle colture dell'ordine del 5-25% a seconda delle condizioni in cui si opera ed a seconda della pianta utilizzata; così Brown et al. (1962) hanno osservato che il pomodoro risponde meglio del grano, lattuga, carota, orzo, spinacio e bietola da zucchero alla inoculazione di *Azotobacter*;

(b) effetti di varia natura sullo sviluppo della pianta, come, accelerazione della germinazione, maggiore crescita delle radici e modificazioni della morfologia radicale, anticipo della fioritura;

(c) controllo delle malattie; la reale portata di questi effetti è difficile da valutare in base ai dati disponibili.

Gli effetti ora menzionati presuppongono che il microrganismo inoculato sia in grado di affermarsi nella zona rizosferica. Le indagini sulla colonizzazione delle radici delle piante da parte di *Azotobacter* inoculato ai semi dimostrano (Brown e coll. 1968) che questo batterio si moltiplica attivamente attorno alle radici e colonizza tutto l'apparato radicale migrando lungo le radici mano a mano che esse crescono. Questo comportamento è sostanzialmente diverso da quello che il batterio segue nel

suolo, ove la capacità di *Azotobacter* a migrare dal punto di inoculazione è trascurabile.

Pertanto oggi possiamo dire che *Azotobacter* inoculato ai semi è in grado di colonizzare massivamente l'apparato radicale e, quindi, di influire sulla crescita vegetale, poiché è noto che questi batteri sintetizzano acido  $\beta$ -indolacetico, acido gibberellico e, verosimilmente, altre sostanze bioattive non ancora identificate.

*Rhizobium* e *Azotobacter* sono un esempio di come un microrganismo sviluppando nella rizosfera possa, in vario modo, risultare benefico per la pianta. Ovviamente ve ne sono molti altri che, nelle opportune condizioni, sono in grado di svolgere azioni favorevoli.

Quanto è stato fatto per l'*Azotobacter* dà una idea dei problemi da affrontare e della strada da battere per individuare le interazioni favorevoli, definirne la natura e stabilire le modalità per renderle operanti nell'ambito della rizosfera.

Rientrano in queste possibilità altri tipi di inoculazione microbica con specie di funghi (micorrizogeni o antagonisti o predatori), di alghe verdi-azzurre azotofissatrici, etc.

Ma introdurre un organismo nel suolo, sommatoria di numerosi microcosmi biologici in equilibrio, è un non senso ecologico se non si applica un simultaneo cambiamento in uno o più fattori che assicurino la vitalità del microrganismo introdotto.

Il successo di una inoculazione, di cui è auspicabile l'applicazione, dipende dalla soluzione di problemi generali di natura ecologica, fisiologica, pedologica ed agronomica.

Perciò lo studio delle modificazioni dell'ambiente terreno con appropriati metodi e mezzi deve essere in pieno accordo con i principi ecologici secondo cui la popolazione può essere modificata nella voluta direzione solo modificando l'habitat.

La maggior attenzione deve rivolgersi alla ricerca degli effetti di vari tipi di ammendanti organici in specie quelli dei concimi verdi, residui secchi delle colture, sostanza organica semplice o complessa, quale disponibile per l'interramento nella normale pratica agricola o che può essere opportunamente apprestata.

Per quanto riguarda infine « l'esca » della lotta biologica dei patogeni, non solo, come scrive Garrett, deve progredire l'ecologia microbica del suolo, ma occorre una stretta collaborazione interdisciplinare tra microbiologia e fitopatologia perché le relazioni ospite-parassiti passano obbligatoriamente nel terreno attraverso la microflora rizosferica e tellurica.

## CONCLUSIONI

Le conclusioni essenziali suggerite dall'inquadramento qui dato al tema della rizosfera, si possono riassumere in pochi punti.

La fondamentale importanza della rizosfera quale centro motore della vita del suolo deve essere meglio compresa dal punto di vista ecologico, pedologico, biochimico e microbiologico.

Le basi chimiche delle relazioni rizosferiche devono essere approfondite e precisate specie per specie di pianta, coltura per coltura per ogni habitat e tipo di terreno. Il carattere specifico dei processi microbiologici di ciascuna rizosfera rende impossibile le generalizzazioni ed implica, ai fini delle prospettive di controllo, conoscenze di base più ampie e più profonde. Fra le varie possibilità d'intervento che si delineano, quelle chimico-agrarie e microbiologiche sono le più interessanti, ma non ancora abbastanza mature per l'impiego pratico. Il problema della sostanza organica esige l'applicazione dei risultati delle ricerche e dei progressi compiuti nella interpretazione dei processi microbiologici di cui diventa substrato e delle ripercussioni favorevoli o sfavorevoli cui può dare origine in funzione della natura, del trattamento, delle condizioni chimico-agrarie ed agronomiche.

Ma pochi metodi di controllo dell'effetto rizosfera offrono maggiori possibilità di resa delle colture e d'incremento della produttività del suolo delle rotazioni, delle adatte consociazioni colturali, della razionale fertilizzazione, minerale ed organica che tenga conto della microbiologia del suolo, dell'adattamento e dei caratteri genetici delle varietà di piante agrarie e forestali.

Metodi promettenti, che nella espressione di Garrett (1959) erano stati « uccisi » proprio dalle ricordate applicazioni agronomiche, sono talora vanificati oggi dagli indirizzi attuali dell'agricoltura e da problemi nuovi, tra i quali i più gravi sono quelli dell'inquinamento, della monocoltura, delle colture sempre più intensive e specializzate, della penuria crescente di sostanza organica ben qualificata, della difesa insomma della fertilità del terreno.

Di questa l'effetto rizosfera è la sintesi di una realtà che oggi si riscopre, ma che nei millenni l'uomo aveva percepito. Lo dimostrano una antica pratica degli indiani d'America, che nelle postarelle in cui seminavano il mais ponevano un pesciolino e un canone importante della millenaria agricoltura cinese, come riferisce Dalgas (1958) in uno scritto di commento a « Sei nuove lettere chimiche sull'agricoltura di J. von

Liebig » e che dice testualmente: « Tranne pel riso, i Chinesi non amministrano l'ingrasso ai campi, ma alle piante. Non pongono seme in terra senza averlo prima tenuto in infusione nell'ingrasso liquido, e senza che abbia cominciato a germogliare, nel qual modo assicurano che lo sviluppo della pianta vien favorito, e che rimane difesa dal guasto degli insetti. Essi, in talune provincie, trapiantano il grano dopo aver fatto germogliare i semi in un piantonaio sopraccarico d'ingrasso, e in tal guisa raccolgono il cento venti e più per ogni seme, da sette e fino a nove steli che getta ciascuna pianta, il qual fruttato compensa il tempo e la fatica richiesti per una simile diligenza ».

#### NOTE BIBLIOGRAFICHE

- AUDUS L.J. (Edit) — *The physiology and biochemistry of herbicides*. Academic Press, London (1964).
- Autori vari — *Interactions nutritionnelles plantes-microorganismes*. Ann. Inst. Pasteur, III, suppl. au n. 3, 346 pp. (1966).
- BAKER K.F. e SNYDER W.C. (Edit) — *Ecology of soil borne plant pathogens*. University of California Press, Berkeley, Los Angeles (1965).
- BALLONI W., CELESTRE M.R., FAVILLI F., MARGHERI M.C. — *Influenza della algalizzazione sulla crescita della fragola in coltura idroponica*. Colloquio « Rapporti Pianta-microorganismi » (1972).
- BANFI G. — *Effetto rizosfera nel terreno ed in idroponiche*. Colloquio « Rapporti pianta-microorganismi » (1972).
- BROWN M.E., JACKSON R.M. e S.K. BURLINGHAM — In: « Ecology of soil bacteria », Liverpool Univ. Press (1968).
- DIXON R.O.D. — *Rhizobia (with particular reference to relationships with host plant)*. Ann. Rev. Microbiol., 23, 137-158 (1969).
- FLORENZANO G. — *Elementi di microbiologia del terreno*. R.E.D.A., Roma (1972).
- GRAY T.R.G. e S.T. WILLIAMS — *Soil microorganisms*. Oliver and Boyd, Edinburgh (1971).
- HUGHES D.E. e A.H. ROSE (Edit.) — *Microbes and biological productivity*. Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge Univ. Press (1970).
- KATZNELSON H. *The role of microbes in agricultural practice*. In: Starr M.P. (Edit.) - Global impacts of applied Microbiology. John Wiley & Sons, Inc. New York (1964).
- MACURA J. e V. VANCURA (Edit.) — *Plant microbes relationships*. Czechoslovak Academy of Sciences (1965).
- McLAREN A.D. e J. SKUJINS — *The physical environment of microorganisms in Soil*. In: Gray T.R.G. e Parkinson D. (Edit.) - The Ecology of soil bacteria. University of Toronto Press, pp. 3-24 (1968).
- PAOLETTI C., FAVILLI F., MATERASSI R. e G. FLORENZANO — *Valutazione dell'azotofissazione rizosferica. con il test della riduzione dell'acetilene*. Colloquio « Rapporti pianta-microorganismi », Pisa (1972).

- PATRICK Z.A. — *Phytotoxic substances associated with the decomposition in soil of plant residues*. Soil Science, III, 13 (1971).
- PICCI G. — *Fitotossine e microrganismi della rizosfera*. Colloquio « Rapporti Pianta-microrganismi », Pisa (1972).
- QUASTEL J.H. — *Microbial activities of soil as they affect plant nutrition*. In: Steward F.C. (Edit.) - Plant physiology. A Treatise, vol. III, 672-756 (1963).
- RICCI D. e W. BALLONI — *Produzione di vitamina B<sub>12</sub> da parte di ceppi efficaci di Rhizobium*. Colloquio « Rapporti Pianta-microrganismi », Pisa (1972).
- ROVIRA A.D. e B.M. McDUGALL — *Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere*. In: McLaren A.D. e Peterson G.H. (Edit.) - Soil Biochemistry. Edward Arnold (Publ.) London (1965).
- ROVIRA A.D. — *Interactions between plant roots and soil microorganisms*. Ann. Rev. Microbiol., 19, 241-266 (1965).
- ROVIRA A.D. — *Plant root exudates*. Bot. Rev., 35, 35-37 (1969).
- SETHUNATHAN N. — *Foliar sprays of growth regulators and rhizosphere effect in Cajanus cajan Millsp. I. Quantitative changes*. Plant and Soil, 33, 62-70 (1970).
- SETHUNATHAN N. — *Foliar sprays of growth regulators and rhizosphere effect in Cajanus cajan Millsp. II. Qualitative changes in the rhizosphere and certain metabolic changes in the plant*. Plant and Soil, 33, 71-80 (1970).
- STARKEY R.L. — *Interrelations between microorganisms and plant roots in the rhizosphere*. Bact. Revs., 22, 154-172 (1958).
- VERONA O. — *Interrelazioni tra microrganismi e pianta*. Colloquio « Rapporti Pianta-microrganismi », Pisa (1972).
- VERONA O. — *Alcuni problemi della microbiologia del terreno*. Ann. Acc. Agr. di Torino, vol. III.
- VERONA O. — *La spermosphère*. Ann. Inst. Pasteur, vol. 95, p. 795.
- WOOD R.K.S., BALLIO A. e A. GRANITI (Edit.) — *Phytotoxins in plant Diseases*. Academic Press N.Y. (1972).

## DISCUSSIONE

Prof. CARILLI

Vorrei chiedere al Prof. Verona di fornirci, se possibile, qualche altro ragguaglio o dato bibliografico sui risultati — per me di grande interesse — che ci ha esposti in relazione alla microflora del polline. Le cognizioni più generalmente diffuse a questo proposito indicano il polline come sostanza non degradabile biologicamente. È noto del resto che proprio a queste capacità di preservazione dei granuli di polline si deve il fatto che essi possono essere riconosciuti con poca difficoltà anche dopo periodi di tempo molto lunghi (consentendo così un approccio molto efficace nello studio delle piante fossili). E non sembra che, a tutt'oggi, sia stata data una risposta soddisfacente alle questioni biochimiche e microbiologiche relative alla natura dell'azione preservatrice del polline. Quindi, se c'è una microflora del polline, questa potrebbe essere dovuta ad uno strato superficiale ma non ad un innesto nei tessuti più profondi di questa sostanza. Un fenomeno del genere presuppone già un inizio di degradazione — o comunque di attacco microbico — che attualmente non viene indicato. Grazie.

Prof. VERONA

Risponderò brevemente al Prof. Carilli che ringrazio della domanda. Può darsi che ci siano lavori sulla microflora superficiale del polline, ma non mi risultano. È nota invece, come ho ricordato nel mio rapporto, la presenza di parassiti, di curiosi parassiti sul polline. Dico curiosi perché si tratta di ficomiceti con esigenze particolari di sviluppo, che amano ambiente idrico, ecc. Sorprende quindi come i granelli di polline possano essere contaminati prima e parassitizzati dopo da funghi con questo comportamento. Inoltre mi risulta, sull'argomento, una bibliografia molto densa, in questa sede naturalmente non riportata, ma che farà parte della pubblicazione relativa la mia comunicazione. Inoltre nella letteratura più recente, peraltro già abbastanza nutrita, il polline viene indicato come stimolante lo sviluppo dei funghi fitopatogeni ed anche l'aggressi-



vità di questi. Nella mia relazione ho ricordato appunto come, talvolta, il polline si soffermi sopra le foglie, in fillosfera, e possa, se per caso le foglie vengono contaminate da qualche fitopatogeno, agevolarne lo sviluppo e consentire loro di essere più aggressivi.

Prof. MATERASSI

Desidero porre una domanda al Prof. Picci ed una al Prof. Banfi. Al Prof. Picci vorrei chiedere se, nell'esame della letteratura sugli effetti delle sostanze fitotossiche a carico dei microrganismi, Egli abbia raccolto notizie circa la possibilità che questi principi esercitino sulla microflora del suolo altri effetti agronomicamente significativi oltre quelli citati nella sua relazione. Se una data sostanza è in grado di produrre squilibri nell'assetto microbiologico del terreno, si può pensare che gli effetti nocivi che essa esercita sulla pianta siano, almeno in parte, di natura indiretta, in quanto conseguenza di tali squilibri.

Al Prof. Banfi volevo chiedere se esistono indicazioni su azioni fitotossiche di metaboliti microbici nelle colture idroponiche. Se è vero che la microflora di queste colture è assai meno numerosa ed attiva rispetto a quella del terreno agrario, nel sistema idroponico le relazioni chimiche fra piante e microrganismi sono più dirette che nel suolo, specialmente per la mancanza dei colloidali che assorbono e neutralizzano molti metaboliti microbici.

Prof. TRECCANI

Vorrei rivolgere al Prof. Banfi due domande: i microrganismi che si moltiplicano nelle soluzioni idroponiche determinano un effetto rizosfera? Vi sono differenze nello sviluppo delle piante coltivate in colture idroponiche sterili in confronto di quelle non sterili?

La seconda domanda verte sui processi di denitrificazione. Nelle colture idroponiche è stata riscontrata una vera denitrificazione con perdita di azoto? In passato ho messo a punto un metodo di valutazione della attività denitrificante per diluizioni successive della terra in esame in terreno colturale sterile; a vari tempi di incubazione ed in tutte le diluizioni, si determina quantitativamente l'azoto totale e qualitativamente la scomparsa dei nitrati e la produzione di nitriti ed ammoniaca (Ann. Micr. 11, 15, 1961).

Con tale metodo si è dimostrato che non è possibile valutare la reale portata del potere denitrificante di un terreno attraverso la sola determinazione della scomparsa dei nitrati. Inoltre si è accertato che anche nei terreni areati a coltura intensiva la denitrificazione è intensa e praticamente uguale alla nitrificazione e quindi deve essere considerata come una normale attività microbica del terreno. Ovviamente nelle colture idroponiche, dove la nitrificazione non è sicuramente molto intensa, la perdita di azoto per denitrificazione non può che essere dannosa.

Ora desidero porre una domanda al Prof. Picci. L'attività fitotossica dei composti derivanti dalla degradazione microbica dei vegetali (ac. p-idrossibenzoico, protocatechico ecc.) è stata determinata solo in vitro oppure anche direttamente nel terreno? Mi sembra infatti improbabile che nel suolo tali composti esplicino una attività fitotossica in quanto non si accumulano perché facilmente e completamente degradabili dai microrganismi del suolo. Un accumulo può verificarsi solo in terreni poco areati perché per la loro degradazione sono necessari processi di ossigenazione.

Prof. PICCI

Al Prof. Materassi rispondo che condivido pienamente l'idea che le sostanze fitotossiche turbino l'equilibrio biologico nell'ambito della rizosfera. Conseguentemente l'effetto fitotossico, considerato nel suo insieme, può avere due componenti: una attribuibile alle fitotossine di per sé, l'altra imputabile al detto turbamento della microflora rizosferica.

Sull'argomento c'è molta letteratura, tuttavia riferentesi alle maramine, come peraltro dice la nota a pag. 13 della mia relazione. Mi risulta invece che siano molto pochi i lavori riguardanti l'influenza delle fitotossine considerate nella relazione — cioè quelle prodotte o liberate dalla pianta — sulla microflora rizosferica. In effetti questo costituirebbe un buon argomento di ricerca.

Al Prof. Treccani rispondo allacciandomi a quell'annoso problema della esistenza e persistenza degli antibiotici nel suolo, poiché c'è una analogia veramente molto stretta nello studio dei due gruppi di composti nel terreno, come del resto di ogni altro metabolita a sede terricola. Pertanto è ben vero che si tratta di composti facilmente attaccabili dal punto di vista biologico, o comunque inattivabili, ma questo niente toglie al fenomeno in sé. È necessario tenere presente che quella quantità di tossine (o altro metabolita) che possiamo reperire nel suolo costituisce la differenza

tra quella prodotta e quella consumata o inattivata. Inoltre, come ha ben precisato PATRICK, è molto importante la metodica nel reperimento di fitotossine nel suolo, come, ad esempio, liberare i residui vegetali dalle particelle terrose aderenti, poiché le fitotossine si diffondono nel terreno dove vengono inattivate od adsorbite dai colloidali oppure sono degradate dalla flora microbica terricola.

Infine, ancora al Prof. TRECCANI, rispondo che non intendevo dire che la demolizione microbica delle fitotossine fosse poco conosciuta, tutt'altro. Quello cui intendevo riferirmi è la demolizione di determinate fitotossine da determinati microorganismi. In altre parole, mentre molti reperti indiretti dimostrano chiaramente la demolizione microbica delle fitotossine, quelli specifici — e con riferimento specialmente ai prodotti intermedi di demolizione — sono piuttosto scarsi. Naturalmente intendo sempre riferirmi alle fitotossine nel senso adoperato nella relazione.

Prof. BANFI

Alla domanda rivoltami dal Prof. MATERASSI non potrò rispondere esaurientemente in quanto le indagini e lo studio sulle azioni indotte da metaboliti nell'ambiente idroponico esula dal campo delle ricerche da noi condotte.

Se le ricerche sulla flora microbica nei substrati idroponici silicei, privi di sostanze organiche, hanno permesso di precisare alcune particolari differenze per determinate attività microbiche in rapporto ai gruppi microbici prevalentemente eterotrofi dei terreni agrari, non è altrettanto ben conosciuta l'influenza dei metaboliti.

Nel corso di esperienze condotte su colture di pomodoro, in serra controllata, si è potuto rilevare più di una volta un fenomeno presumibilmente analogo alla così detta « stanchezza del terreno ». Ciò si è verificato solamente per colture ripetute nel medesimo substrato non trattato preventivamente con disinfettanti e disinfestanti. Le piantine subivano, temporaneamente, un certo arresto vegetativo, per riprendere poi sino a livelli produttivi sub-ottimali o addirittura mediocri.

Nei substrati silicei previamente trattati con formalina all'1% la coltura non subiva arresti vegetativi ed era più vigorosa.

In idroponica e per determinate specie vegetali, proprio in relazione ai complessi processi biologici reversibili dell'effetto rizosfera, è possibile si verificino fenomeni di accumulo di metaboliti per graduale arricchimento selettivo di determinati gruppi microbici incapaci di partecipare ad

una completa evoluzione dei cicli biologici più strettamente connessi alla presenza di sostanze organiche degradabili; tenuto inoltre presente che la natura fisico-chimica di un substrato siliceo idroponico tanto si differenzia da quella di un suolo dotato di colloidali ad elevato potere assorbente e tampone.

Purtroppo non posso che limitarmi a considerazioni d'ordine generale, ma la conoscenza delle cause e della natura dei fenomeni segnalati per l'ambiente idroponico, soprattutto per alcuni sistemi di allestimento e di conduzione, suscita un interesse certamente non inferiore a quello che lo studio del terreno presenta per analoghi problemi connessi agli effetti rizosfera.

Rispondo alla prima domanda rivolta dal Prof. TRECCANI. L'effetto rizosfera inteso come influenza del metabolismo microbico sulla pianta, nelle soluzioni idroponiche, è stato da noi valutato indirettamente nel corso di ricerche aventi lo scopo di saggiare l'influenza di estratti e di essudati vegetali su ceppi di microrganismi isolati da substrati idroponici (Ist. Lom. (Ren. Sc.) 97, 373-397, 1963). Le prove comparative condotte in condizioni di substrato sterile e inoculato hanno dimostrato reazioni nettamente positive per le piantine di *Zea mays* e di *Vigna sinensis*, mentre sono risultate incerte o negative per *Raphanus sativus*. Il comportamento di quest'ultima specie sui ceppi di microrganismi studiati conferma in certo modo quanto osservato da CORBERI circa un'azione analoga esercitata da *Tulipa gesneriana* (Ann. Micr. 6, 179, 1955).

È bene tuttavia sottolineare che mentre l'effetto rizosfera come azione della pianta sulla flora microbica è suscettibile di controllo, considerato nella direzione inversa non è sempre facilmente apprezzabile soprattutto per le difficoltà comparative tra i mezzi di ricerca artificiali e naturali.

Una risposta dettagliata alla seconda domanda del Prof. TRECCANI porterebbe ad un lungo discorso poiché in realtà essa comprende 3 aspetti di particolare importanza nello studio dei processi di denitrificazione.

Per il primo punto dirò che nelle soluzioni idroponiche contenenti nitrato quale fonte azotata per i vegetali superiori la percentuale di batteri, anaerobi facoltativi dotati di potere denitrificante, è risultata sempre elevata, circa il 70-74% del totale dei ceppi isolabili con i comuni mezzi standard di coltura. Tuttavia nella premessa di una nota (Ann. Micr. 17, 99-114, 1967) che riferiva di ricerche da noi effettuate su colture di pomodoro idroponiche e nella rassegna bibliografica dove tra l'altro si richiamava il lavoro menzionato dal Prof. TRECCANI circa la metodologia e la sua validità per la valutazione del processo riduttivo nel terreno, veniva da noi precisato che l'interesse del lavoro consisteva essenzialmente

nel valutare il potere denitrificante non come perdita di azoto, ma come entità di carica microbica dotata di tale potere.

A parte la considerazione che alcuni Autori, POCHON ad esempio, sostengono che la « vera denitrificazione » nei substrati di interesse agrario è un processo riduttivo molto limitato in rapporto alla denitrificazione nel suo complesso, nelle ricerche sopra segnalate non abbiamo ritenuto particolarmente interessante indagare su tale rapporto.

Riguardo al secondo punto, circa il controllo quantitativo e qualitativo sui nitrati, risultava sufficientemente rispondente, per lo scopo della nostra ricerca, l'impiego delle tecniche colorimetriche con brucina per  $\text{NO}_3$ , con alfanaftilamina acetato per  $\text{NO}_2$  e reattivo di Nessler per  $\text{NH}_3$ . Analisi chimiche complementari con determinazione dell'azoto nelle sue varie forme e in rapporto alla variazione del titolo totale, in ambiente suscettibile di controllo, a mio avviso, sono in ogni caso utili anche se richiedono una qualche particolare interpretazione.

Per il terzo punto, se nel terreno agrario la denitrificazione è da ritenersi un fenomeno biologico normale la cui compensazione nel ciclo evolutivo dell'azoto avviene per processi ossidativi inversi, nelle soluzioni idroponiche dove in realtà, per la natura particolare del substrato, la nitrificazione risulta molto scarsa o nulla (Agrochimica, 11, 328-335, 1971), la riduzione dei nitrati da parte dei microrganismi in genere può divenire per certi valori e per determinate specie vegetali un fattore negativo. Tuttavia si è potuto notare che, ai fini di una buona coltivazione idroponica, non tanto preoccupa la perdita di azoto quanto un accumulo di nitriti a concentrazioni piuttosto elevate con conseguente alterazione dell'equilibrio chimico dei principi nutritivi in soluzione. Pertanto in tal caso è impreciso parlare solamente di attività competitiva tra vegetali superiori ed inferiori, senza tenere in debito conto la probabile azione dei prodotti intermedi della reazione.

ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELL'UNIVERSITÀ DI MILANO  
CATTEDRA DI MICROBIOLOGIA DEL TERRENO

E. CORBERI - M.L. SOLARO

PRESENZA DI MICRORGANISMI PREDATORI  
(*BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS*)  
IN DIVERSI TERRENI COLTIVATI

Il *Bdellovibrio bacteriovorus* è un batterio scoperto recentemente da due studiosi, STOLP e PETZOLD, nel 1962 a Berlino, nel corso di una ricerca volta ad isolare batteriofagi dal terreno (1). La caratteristica più saliente di questa nuova forma microbica è la sua capacità predatoria nei confronti di altri batteri, poiché entra in microrganismi vivi e si moltiplica nel loro interno. Il ritardo nella individuazione di questo microrganismo deve attribuirsi al fatto che i processi di lisi batterica venivano riferiti soprattutto ai fagi, le cui tecniche di isolamento non consentono la sopravvivenza di *Bd. b.* eventualmente presenti. La sua diffusione è apparsa subito notevole in diversi ambienti naturali, come le acque ed il suolo; così pure il suo spettro di azione parassitica è risultato piuttosto ampio, attaccando preferenzialmente microrganismi gram-negativi; inoltre la diversa gamma dei batteri in grado di essere parassitati, mette in luce l'esistenza di ceppi fra loro differenziati. Tra i microrganismi attaccati notiamo diversi patogeni per le piante e qualche enterobatterio, ad esempio: *Erwinia amylovora*, *E. atroseptica*, *E. carotovora*, *Pseudomonas glycinea*, *Ps. fluorescens*, *Ps. solanacearum*, *Ps. syringae*, *Ps. tabaci*, *Xantomonas faseoli*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella paratyphi*, *S. typhosa*, *S. typhimurium*, *Streptococcus faecalis*, *Serratia marcescens* (2).

Il *Bd. b.* appartiene alla famiglia delle *Spirillaceae*, genere *Vibrio*, ha forma di bastoncino ricurvo, è dotato di un lungo flagello e si muove a scatti assai velocemente. Le sue dimensioni variano da 0,3-0,4  $\mu$  di larghezza per 0,6-2  $\mu$  circa di lunghezza. Il nome, derivante dal greco *bdello* = sanguisuga, si riferisce al caratteristico modo di attacco ad un altro

batterio; infatti quando viene a contatto di un microrganismo suscettibile d'essere parassitato, aderisce tenacemente alla sua parete con l'estremità opposta a quella nella quale è inserito il flagello, che è molto sottile nonostante sia ricoperto da una guaina, e subito dopo la cellula attaccata, detta ospite, si arrotonda dando luogo allo sferoplasto (1). Studi al microscopio elettronico hanno mostrato che il *Bd. b.* penetra al di sotto della parete cellulare dell'ospite passando da una piccola apertura da lui provocata, senza per altro entrare nel citoplasma, e si accresce internamente sotto forma di spirale immobile, che frammentandosi, forse con andamento sequenziale, dà luogo a 4-7 nuove cellule (vedi fig. 1-4). Lo sferoplasto quindi si lisa e dal suo disfacimento emergono le nuove cellule del parassita (3,4). Quando il *Bd. b.* viene piastrato con batteri ospiti, forma alla superficie del terreno culturale delle placche di lisi simili a quelle prodotte da un'infezione di fagi. In seguito, approfondendo le ricerche, è emerso che da colture di *Bd. b.* è possibile isolare stipiti non parassiti, capaci, cioè, di moltiplicarsi in substrato privo di ospite, ma in grado di conservare latente nella loro discendenza un parassitismo potenziale (5). I due eventi, isolamento del ceppo indipendente dall'ospite e sua possibilità di dare di nuovo stipiti parassitici, hanno però una bassa frequenza. Infine sono stati trovati anche due ceppi parassiti facoltativi cioè capaci di essere contemporaneamente parassiti e saprofiti. Il più recente dei due, isolato da alcuni autori americani (6,7), è l'UKi2 che è in grado di crescere sia parassiticamente in *Escherichia coli*, sia saprofiticamente in terreno culturale privo di ospite. È da sottolineare che la ubiquitaria capacità di sviluppo è rimasta stabile anche dopo 250 trapianti culturali. Questo è molto importante perché la disponibilità di un *Bd. b.* parassita facoltativo, ha rappresentato un valido mezzo per lo studio della sua fisiologia ed anche per indagare sulla natura del legume ospite parassita. Dalla ricerca su questo ceppo sono emersi alcuni dati che sembra possano essere ritenuti estensibili, con una certa approssimazione, ai comuni *Bd. b.* L'accrescimento saprofitico è quasi nullo su nutrient broth Difco e su substrati ricchi di sostanze nutritive, è buono in terreni poveri, sui quali da luogo a piccolissime colonie puntiformi, trasparenti, di colore bianco grigio. È aerobio, catalasi positivo, riduce i nitrati, dà emolisi, idrolizza la gelatina, dà proteasi extracellulari, non svolge idrogeno solforato, non dà indolo, è negativo alla reazione del rosso metile e di Voges-Proskauer, non dà acidi da 18 fonti di carbonio, non tollera il 3,5% di cloruro di sodio. La curva di accrescimento in stato saprofitico mette in evidenza che il numero delle cellule rimane costante nelle prime 7-8 ore, cioè nel periodo in cui i vi-

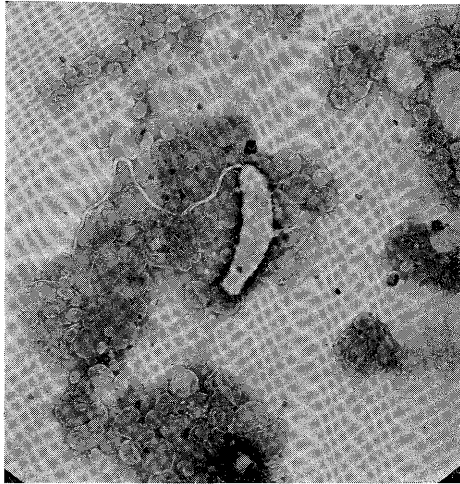


Fig. 1. — *Bdellovibrio bacteriovorus*.  
28.000 X.

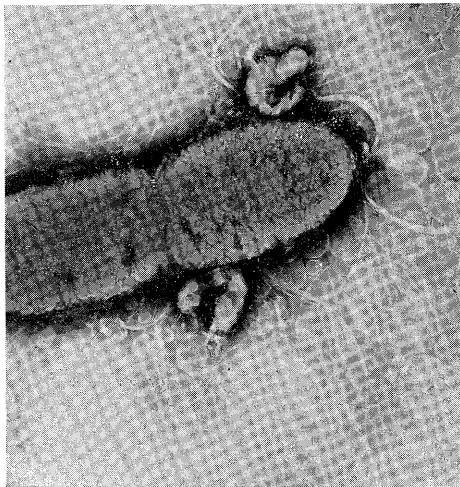


Fig. 2. — *Bdellovibrio bacteriovorus*  
su *Serratia marcescens*. 28.000 X.



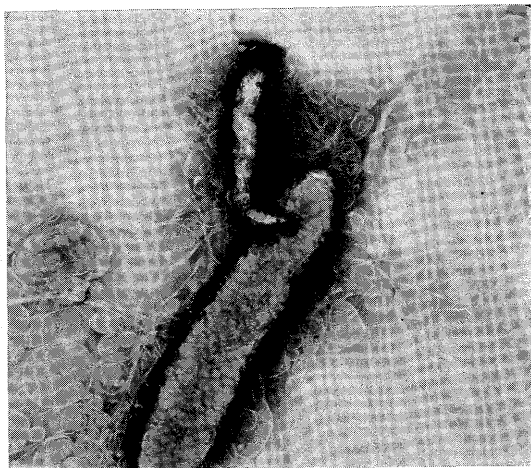


Fig. 3. — *Bdellovibrio bacteriovorus* su *Serratia marcescens*. 32.000 X.

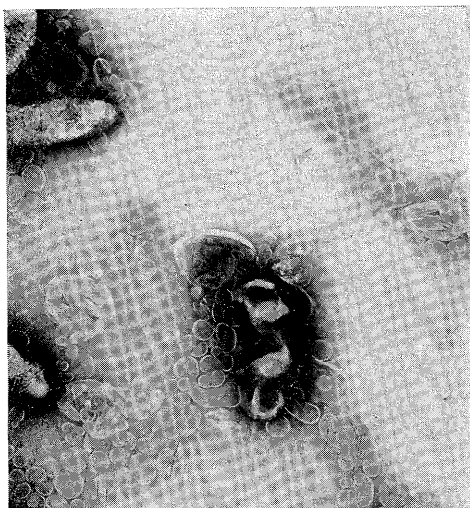


Fig. 4. — Spirale di *Bdellovibrio bacteriovorus* isolato da terra di Torrenieri su *Serratia marcescens*. 20.000 X.

brioni si trasformano in lunghe spirali, mentre aumenta notevolmente tra l'8<sup>a</sup> e la 12<sup>a</sup> ora, quando questi si disarticolano in 7-10 elementi mobilissimi. La curva di accrescimento in stato parassitico ha uno svolgimento del tutto analogo alla prima, differendo da questa solo per la formazione dello sferoplasto dall'ospite e per il minor numero di vibriani che si forma dalla spirale in esso contenuta, numero che è di solo 4-7 elementi. Questo fatto sottolineerebbe che le condizioni ambientali e nutrizionali giocano un ruolo notevole nella crescita della spirale.

Come abbiamo detto inizialmente, l'habitat di questo parassita è vario: è stato isolato dal suolo, da acque palustri, di scolo, da acque luride, da fanghi grezzi ed attivati e da acque marine. Le regioni nelle quali è stato messo in evidenza sono diverse: Germania (1), California (8), Francia (9); Stati Uniti (10); Honolulu, Isole Haway (9); Italia: in Campania, da acque luride (11), e in Sicilia, dal lago salmastro di Ganzirri (2), Israele (5), Australia (12). In base a tali dati sembra evidente che la sua diffusione in natura sia veramente notevole e forse l'equilibrio ecologico della popolazione microbica, per questa ragione, potrebbe anche avvalersi della presenza di tale specie. In questa sede riferiamo brevemente sulle ricerche da noi svolte allo scopo di rilevare la presenza di questo microrganismo nel suolo italiano. Abbiamo preso in esame terreni variamente coltivati della Lombardia, Piemonte, Veneto e Toscana in totale 30 località. Da ogni terreno abbiamo isolato il *Bd.b.* insieme al suo ospite ed inoltre abbiamo saggiata la capacità predatoria di un ceppo di *Bd.b.* ATCC verso azotobatteri e rizobi, che sembrerebbero essere solo parzialmente soggetti a tale azione (12, 13).

#### RISULTATI.

In tutti i 30 terreni esaminati i microrganismi predatori sono risultati presenti e si sono dimostrati spesso anche in grado di crescere contemporaneamente su 2 o 3 ospiti. Il metodo di ricerca che abbiamo seguito tentava inoltre di dare una valutazione anche quantitativa alla loro presenza. Esso si basava sull'inseminamento di diluizioni opportune di filtrati delle terre in esame, su piastre allettate 24 ore prima con microrganismi ospiti che servivano da substrato alimentare. I microrganismi ospiti utilizzati sono stati l'*Escherichia coli* ATCC 15144, il *Proteus mirabilis* ATCC 15363 e la *Serratia marcescens* ATCC 15365. I predatori venivano valutati in base alla diluizione limite suscettibile di formare aree trasparenti sulla patina microbica che ricopriva tutta la superficie delle piastre,

se ciò era confermato da una seconda serie di piastre allestite con il materiale ottenuto nella prima e dopo osservazione al microscopio a contrasto di fase. Alla fine della ricerca è emerso che questa seconda parte, cioè l'allestimento delle piastre di conferma, poteva essere superflua e limitata solo ad un accurato controllo microscopico della prima serie di piastre. Da tutto ciò in conclusione, è risultato che i predatori erano sempre presenti in tutti i campioni di terra esaminati, e nella maggioranza dei casi fino alla diluizione di  $10^{-2}$  e due sole volte fino a  $10^{-4}$ . I campioni provenivano sia da terreni privi di vegetazione, sia da incolti che da terreni coltivati a giardino, orto, granoturco, frumento, vigneto, uliveto e bosco di castagno. Anche l'origine pedologica, la composizione e struttura dei terreni, erano diverse di volta in volta, essendo stati, i campioni, prelevati in regioni lontane le une dalle altre. Non sono state notate correlazioni tra numero di *Bd.b.* e tipo di coltivazione. Forse, invece a grandi linee, si potrebbe intravedere un rapporto tra quantità di predatori e presenza nel terreno di humus ed umidità. Infatti i campi appena arati, gli incolti, gli oliveti, i castagneti, in genere più secchi e meno ricchi di sostanza organica si sono dimostrati, complessivamente, più poveri di *Bd.b.* rispetto agli orti, ai terricciati per giardino, come pure agli argini di rogge e di fossi nei quali scorreva acqua. Tutti i *Bd.b.* presenti, in maggiore o minor numero, nei campioni esaminati, sono stati isolati usando come microrganismo ospite quello sul quale avevano prodotto le aree più nette. L'ospite che in questa serie di isolamenti si è rivelato come il miglior substrato, cioè è stato utilizzato in maniera preferenziale, 13 volte, è l'*Escherichia coli*, contro 8 e 9 rispetto agli altri due. Infine, visto che in tutti i terreni esaminati un predatore era presente, ci è sembrato interessante saggiarne la capacità parassitica verso gli *Azotobacter* ed i *Rhizobium*. A questo scopo abbiamo messo a contatto per 3-6 giorni, una cultura di *Bd.b.*, il ceppo 118 ATCC, ed i due gruppi di fissatori d'azoto, che erano stati fatti crescere in diversi terreni culturali ed abbiamo controllato al microscopio a contrasto di fase sia l'eventuale diminuzione del numero dei fissatori d'azoto, sia se questi risultavano attaccati dai primi, in confronto, naturalmente a controlli nelle stesse identiche condizioni ma privi del parassita. Da questa prova è risultato che gli *Azotobacter* possono essere più o meno suscettibili all'attacco del predatore, a seconda del substrato sul quale erano state fatte crescere le culture. Infatti l'attività predatoria del *Bd.b.* è apparsa notevole per le cellule che provenivano dai substrati al benzoato e piruvato, minore per il nutrient broth, e lieve o nulla per l'Ashby. Questa differente suscettibilità all'azione del parassita potrebbe essere interpretata come derivante dal grado di vigoria dell'o-

spite, determinato da un substrato colturale più o meno adatto. I *Rhizobium*, invece, non hanno mostrato alcuna differenza sensibile rispetto ai relativi controlli. Risulterebbe quindi che, almeno in queste condizioni sperimentali, i ceppi di *Azotobacter* e di *Rhizobium*, saggiati, possono resistere, in linea di massima, i primi un po' meno, i secondi bene all'azione predatrice del parassita. Sembra quindi di poter concludere che il *Bdellovibrio bacteriovorus* è un microrganismo notevolmente diffuso nella terra coltivata e ricca di sostanza organica, dove forse ha la possibilità di incontrare con maggiore frequenza specie batteriche appartenenti a generi che può facilmente aggredire, come *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, ed inoltre anche altre che in mancanza di queste è probabilmente in grado di parassitare.

#### RIASSUNTO

In diversi terreni italiani è stato ricercato un microrganismo, il *Bdellovibrio bacteriovorus* di Stolp e Petzold, dotato di capacità predatoria nei confronti di altri batteri, poiché entra in microrganismi vivi, si nutre e si moltiplica nel loro interno. I terreni studiati sono stati 30 ed in tutti il parassita è stato ritrovato ed isolato. L'attività predatoria di un ceppo di *Bd.b.*, saggiata verso *Azotobacter* e *Rhizobium*, è risultata debolmente positiva per i primi e negativa per i secondi.

#### SUMMARY

*Bdellovibrio bacteriovorus* Stolp and Petzold has been found in different Italian soils. This bacteria is able to penetrate, grow and multiply in living microorganisms. In all the 30 samples of soils examined *Bd.b.* has been found and isolated. The parasitic activity has been proved slightly positive against *Azotobacter* and negative against *Rhizobium*.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) STOLP H., PETZOLD H. - *Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für Pseudomonas-Bakterien*. Phytopath. Z., 45, 364, 1962.
- 2) MAUGERI P.L. - *Bdellovibrio bacteriovorus*. Boll. Ist. Sieroter. Milan, 48, 84, 1969.
- 3) STARR M.P., BAIGENT N.L. - *Parasitic interaction of Bdellovibrio bacteriovorus with other bacteria*. J. Bact., 91, 2006, 1966.
- 4) BURNHAM J.C., HASHIMOTO T. and S.F. CONTI - *Electron microscopic observations on the penetration of Bdellovibrio bacteriovorus into gram-negative bacterial host*. J. Bact. 96, 1366-1381, 1968.
- 5) SHILO M., BRUFF B. - *Lysis of gram-negative bacteria by host independent ectoparasitic Bdellovibrio bacteriovorus isolates*. J. gen. Microbiol., 40, 317, 1965.

- 6) DIEDRICH D.L., DENNY C.F., HASHIMOTO T., and S.F. CONTI - *Facultatively parasitic strain of « Bdellovibrio bacteriovorus »*. J. Bact., 101, 989-996, 1970.
- 7) BURNHAM J.C., HASHIMOTO T., and S.F. CONTI - *Ultrastructure and cell division of a facultatively parasitic strain of « Bdellovibrio bacteriovorus »*. J. Bact., 101, 997-1004, 1970.
- 8) STOLP H., STARR M.P. - *Bdellovibrio bacteriovorus gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism*. Antonie v. Leeuwenhoek, 29, 217, 1963.
- 9) GUÉLIN A., LÉPINE P., LAMBLIN D. - *Pouvoir bactéricide des eaux polluées et rôle de Bdellovibrio bacteriovorus*. Ann. Inst. Pasteur, 113, 660, 1967.
- 10) KLEIN D.A., CASIDA L.E. jr. - *Occurrence and enumeration of Bdellovibrio bacteriovorus in soil capable of parasitizing Escherichia coli and indigenous soil bacteria*. Canad. J. Microbiol., 13, 1235, 1967.
- 11) PAOLETTI A., DE SIMONE E., FERRO V., ORSI C., CAMPANILE E. - *Un nuovo fattore di autodepurazione delle acque: Bdellovibrio bacteriovorus*. Rivista Italiana d'Igiene, 27, 466, 1967.
- 12) PARKER C.A., GROVE P.L. - *Bdellovibrio bacteriovorus parasitizing Rhizobium in Western Australia*. J. Appl. Bact. 33, 253-255, 1970.
- 13) SULLIVAN C.W., CASIDA L.E. jr. - *Parasitism of Azotobacter and Rhizobium species by Bdellovibrio bacteriovorus*. Antonie v. Leeuwenhoek, 34, 188, 1968.

CENTRO DI STUDIO DEI MICRORGANISMI AUTOTROFI DEL C.N.R. PRESSO  
L'ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELL'UNIVERSITÀ DI FIRENZE

*Direttore:* Prof. GINO FLORENZANO

L. TOMASELLI - R. MATERASSI

### INIBIZIONE DELLA GERMINAZIONE AD OPERA DELLA MICOFLORA DEI SEMI

Quantunque la capacità di certi funghi a produrre metaboliti tossici sia nota da tempo immemorabile, si può dire che un attivo interesse verso questo aspetto della biochimica fungina sia sorto solo dopo la scoperta, avvenuta circa 10 anni orsono, delle aflatossine, un gruppo di agenti tossici particolarmente potenti. L'interesse della ricerca in questo campo si è orientato soprattutto allo studio delle tossine attive sugli animali, per i rischi che le micotossicosi comportano per la salute umana e per le implicazioni economiche delle micotossicosi degli animali domestici. Tuttavia, non mancano in letteratura notizie sulla attività fitotossica di metaboliti fungini. (VERONA 1972; DOMSCH, 1965; SCHOENTAL e WHITE 1965).

Nel nostro Istituto sono state intraprese delle ricerche sulla produzione di fitotossine da parte degli eumiceti, con particolare riguardo alla individuazione delle specie attive ed alla determinazione della loro distribuzione nei terreni e nella rizosfera delle piante. Una prima indagine, oggetto della presente comunicazione, è stata rivolta alla determinazione della presenza sui semi di alcune piante, di eumiceti produttori di sostanze inibenti la loro germinazione.

#### MATERIALI E METODI

I ceppi eumicetici impiegati nell'indagine sono stati isolati a partire da cariossidi di grano, orzo, riso e mais.

Per l'isolamento di un campione rappresentativo della flora eumicetica delle cariossidi, si procedette come segue:

(a) circa 10 g di cariossidi erano poste in 100 ml di acqua sterile. Dopo 10 primi di agitazione piuttosto energica, una aliquota del liquido veniva prelevata, diluita e seminata in scatole Petri;

(b) cariossidi sottoposte a 5 lavaggi consecutivi in acqua sterile, come specificato al punto (a), furono prelevate sterilmente e deposte alla superficie dell'agar in scatole Petri;

(c) oltre alle cariossidi lavate, si procedette alla semina di cariossidi la cui superficie era stata disinfettata per immersione in soluzione di sublimato corrosivo all'1‰.

Come substrati di coltura furono usati l'agar Czapek, l'agar Martin, e l'agar patata-destrosio. Le piastre furono incubate a 25°C ed esaminate periodicamente per la comparsa di colonie eumicetiche. Dalle piastre si procedette all'isolamento delle colonie fungine mano a mano che esse comparivano.

Per accertare la produzione, da parte dei ceppi eumicetici isolati, di metaboliti aventi azione inibente sulla germinazione dei semi, ogni ceppo venne coltivato in un mezzo Czapek-Dox modificato per aggiunta di estratto di arachidi (100 ml/litro di mezzo di coltura) e di tryptone (10 g/litro).

Le colture furono effettuate in beute ed incubate per 5 giorni in un agitatore termostato a 27°C, trascorsi i quali il liquido di coltura venne separato dal micelio per filtrazione su filtro Seitz e conservato in frigo fino al momento del saggio.

L'azione dei liquidi colturali fu saggiata su semi di frumento, trifoglio violetto e crescione (*Cardamine pratensis*). Il saggio venne effettuato introducendo in scatole Petri (sul fondo delle quali era stato posto un disco di garza prima della sterilizzazione) 20-30 semi la cui superficie era stata sterilizzata per immersione in soluzione di HgCl<sub>2</sub> e successivi lavaggi. Prima della introduzione dei semi la garza era stata saturata con il filtrato colturale. Come testimoni furono allestite piastre con garza impregnata del mezzo di coltura.

Per ogni filtrato colturale e per ogni seme furono allestite tre piastre. Nei casi di contaminazione le prove furono ripetute.

A partire dal terzo giorno di incubazione furono determinate, su ogni piastra, le quantità di semi germinati. Le osservazioni furono protratte fino al sesto giorno.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Complessivamente sono state isolate 297 colture eumicetiche appartenenti a 15 generi. I generi più rappresentati sono risultati: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus* e *Fusarium*. Ad essi seguono per importanza *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Thielavia* e *Trichothecium*.

Nella tabella I sono esposti, in forma analitica, i dati riguardanti l'attività dei filtrati colturali dei ceppi eumicetici sui semi di grano, trifoglio e crescione. Nella tabella 2 gli stessi dati sono esposti in sintesi.

La colonna A contiene i ceppi che hanno prodotto una inibizione nella germinazione inferiore al 50%, al sesto giorno, rispetto alla prova testimone. La colonna B raccoglie quei ceppi che hanno manifestato l'effetto inibitore più energico (superiore al 50%).

Una prima osservazione da fare riguarda la diversa sensibilità dei semi impiegati alla azione dei principi inibitori prodotti dai funghi. Infatti il trifoglio e, soprattutto il crescione si sono dimostrati molto più sensibili del frumento ai filtrati colturali. Questa differenza di comportamento probabilmente è in misura non indifferente da attribuire alle minori dimensioni dei semi delle due foraggere rispetto alle cariossidi di grano, il che ha facilitato nei primi la penetrazione dei principi inibitori.

Complessivamente il comportamento delle 297 colture eumicetiche è risultato il seguente:

	grano	crescione	trifoglio
nessuna attività	147	130	131
inibizione inferiore al 50%	129	80	109
inibizione superiore al 50%	21	87	57

La più energica attività inibitrice è stata riscontrata in alcune specie di *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ed *Alternaria*. Tutti i 21 ceppi di *Aspergillus flavus* hanno manifestato un effetto piuttosto marcato, specialmente sulle due foraggere. Su crescione tutti i 21 ceppi di *A. flavus* hanno dato inibizione sempre superiore al 50% e talvolta prossima al 100%.

Anche i 19 ceppi di *Penicillium cyclopium* ed i 5 ceppi di *P. nigricans* hanno esercitato azione di inibizione piuttosto marcata. Fra i funghi del genere *Rhizopus* le 16 colture di *Rhizopus nigricans* sono risultate notevolmente attive, specialmente su crescione e trifoglio. Anche *Trichothecium roseum* si è mostrato assai attivo, infatti le 12 colture di



Tabella 1. - Attività di filtrati culturali di 263 ceppi eumicetici sulla germinazione del frumento, crescita e trifoglio rosso. I ceppi sono suddivisi in base alla entità della inibizione dedotta dalla percentuale di germinazione rispetto ai testimoni dopo 6 giorni di incubazione (N=nessuna inibizione; A=inibizione inferiore al 50%; B=inibizione superiore al 50%).

Organismo	n. totale ceppi saggiati	Frumento			Crescione			Trifoglio rosso		
		N	A	B	N	A	B	N	A	B
<i>Alternaria tenuis</i>	13	1	12	—	1	8	4	1	10	2
<i>Alternaria spp.</i>	8	—	5	3	—	4	4	—	4	4
<i>Aspergillus candidus</i>	2	2	—	—	2	—	—	2	—	—
<i>Aspergillus fisheri</i>	5	5	—	—	5	—	—	5	—	—
<i>Aspergillus fumigatus</i>	16	11	3	2	5	4	7	5	9	2
<i>Aspergillus flavus</i>	21	—	21	—	—	—	21	—	2	19
<i>Aspergillus niger</i>	3	—	3	—	—	3	—	—	3	—
<i>Aspergillus spp.</i>	16	8	5	3	6	—	10	6	5	5
<i>Botrytis cinerea</i>	6	6	—	—	6	—	—	6	—	—
<i>Cephalosporium acremonium</i>	4	2	2	—	—	4	—	—	4	—
<i>Cephalosporium sp.</i>	1	—	1	—	—	1	—	—	1	—
<i>Chaetomium bostrycodes</i>	1	1	—	—	1	—	—	1	—	—
<i>Chaetomium globosum</i>	6	1	5	—	—	6	—	—	6	—
<i>Chaetomium indicum</i>	3	3	—	—	3	—	—	3	—	—
<i>Cladosporium herbarum</i>	11	8	3	—	4	6	1	4	7	—
<i>Cladosporium hordei</i>	2	—	2	—	—	2	—	—	2	—
<i>Epicoccum nigrum</i>	9	—	9	—	—	9	—	—	9	—
<i>Fusarium graminearum</i>	3	—	3	—	—	3	—	—	2	1
<i>Fusarium spp.</i>	18	5	11	2	4	8	6	4	12	2
<i>Fusidium corneolum</i>	9	9	—	—	8	1	—	9	—	—
<i>Mucor racemosus</i>	7	7	—	—	7	—	—	7	—	—
<i>Mucor hiemalis</i>	3	3	—	—	3	—	—	3	—	—
<i>Mucor sp.</i>	1	1	—	—	1	—	—	1	—	—
<i>Penicillium citrinum</i>	13	13	—	—	13	—	—	13	—	—
<i>Penicillium cyclopium</i>	19	—	12	7	—	9	10	—	9	10
<i>Penicillium nigricans</i>	5	—	5	—	—	4	1	—	3	2
<i>Penicillium spp.</i>	16	10	6	—	10	—	6	10	6	—
<i>Rhizopus nigricans</i>	11	2	9	—	—	—	11	—	3	8
<i>Rhizopus nodosus</i>	24	22	—	2	22	—	2	22	—	2
<i>Rhizopus stolonifer</i>	7	7	—	—	7	—	—	7	—	—
<i>Syncephalastrum racemosus</i>	8	8	—	—	8	—	—	8	—	—
<i>Thielavia sepedonium</i>	14	14	—	—	14	—	—	14	—	—
<i>Trichotbecium roseum</i>	12	—	12	—	—	8	4	—	12	—

Tabella 2. - Quadro riassuntivo della attività inibitrice, nei riguardi della germinazione dei semi, di 297 colture eumicetiche isolate da cariossidi di orzo, mais, riso e grano.

Genere	n. totale ceppi esaminati	N. ceppi che inibiscono la germinazione					
		grano		crescione		trifoglio rosso	
		A	B	A	B	A	B
<i>Alternaria</i>	21	17	3	12	8	14	6
<i>Aspergillus</i>	63	32	5	7	38	19	26
<i>Fusarium</i>	21	14	2	11	6	14	3
<i>Penicillium</i>	53	23	7	13	17	18	12
<i>Rhizopus</i>	42	9	2	—	13	3	10
Altri generi	97	34	2	37	5	41	—

A = Inibizione superiore al 50%

B = Inibizione inferiore al 50%

questa specie hanno manifestato tutte attività inibitrice più o meno elevata. Infine, fra i funghi attivi produttori di principi inibitori della germinazione occorre annoverare anche il genere *Alternaria* dato che, con l'eccezione di una delle 13 colture di *A. tenuis*, le 21 colture di questo genere esercitano effetto inibente spesso assai marcato.

In diverse specie, fra le quali *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* e *Rhizopus nodosus*, accanto a colture i cui filtrati si erano rivelati del tutto inattivi, ve ne erano altre dotate di attività inibitrice. Una tale irregolarità di comportamento è tipica dei metaboliti secondari, ai quali va attribuito l'effetto inibitore, e che in genere sono specifici a livello di singola specie o, addirittura, di singoli ceppi.

Infine, fra le specie risultate del tutto inattive si possono citare *Aspergillus fisheri* ed *A. candidus*, gli 11 ceppi del genere *Mucor*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium citrinum* e *Thielavia sepedonium*.

Le possibili conseguenze pratiche, ai fini della germinazione dei semi, della presenza nell'ambito della microflora epifitica di essi, di un considerevole numero di ceppi fungini capaci di produrre metaboliti che ritardano od inibiscono la germinazione, sono difficili da valutare. Il problema si inquadra nell'insieme dei fatti legati all'effetto seme ed il Prof. Verona, nella sua relazione generale, ha sottolineato il ruolo che la microflora spermatosferica può avere in certe irregolarità di germinazione dei semi in campo ed ha citato alcuni casi in cui metaboliti tossici prodotti da taluni componenti la microflora del seme, ad esempio da *Aspergillus*

*flavus*, sono chiaramente responsabili di anomalie nello sviluppo delle piantine.

Un primo elemento di giudizio per valutare la possibilità che gli effetti sfavorevoli sulla germinazione hanno di manifestarsi è rappresentato dalla conoscenza della estensione con cui i funghi dei semi sono capaci di sviluppare nell'ambito della spermatosfera. Le opinioni al riguardo non sono concordanti e riflettono, ovviamente, le differenti condizioni nelle quali hanno operato coloro che hanno investigato questo problema.

Le osservazioni di PETERSON (1959) fanno ritenere che i funghi del seme non possano sviluppare in maniera apprezzabile, dato che la microflora che colonizza le giovani radichette primarie all'atto della loro emergenza è diversa da quella del seme. Viceversa i dati di CATSKA et al. (1960) e quelli di DICKINSON e PUGH (1965), che accordano alla microflora del seme una certa capacità a colonizzare le radici, fanno pensare che almeno alcuni funghi dei semi siano in grado di moltiplicarsi nella spermatosfera.

In definitiva, i dati della presente indagine mostrano che la capacità a produrre metaboliti fitotossici da parte dei funghi dei semi è da tenere presente, per le sue potenziali conseguenze pratiche. Fra l'altro, una migliore conoscenza delle relazioni fra tossicità per le piante e capacità a produrre micotossicosi sugli animali, che i dati da noi ottenuti prospettano in modo evidente, può rappresentare la base per mettere a punto tests semplici ed efficaci di rivelazione della presenza di funghi micotossicogeni sui semi e sui prodotti alimentari.

#### RIASSUNTO

È stata saggiata l'azione esercitata sulla germinazione dei semi di frumento, trifoglio rosso e crescione, di estratti colturali di 297 ceppi eumicetici, appartenenti a 16 generi differenti, isolati da cariossidi di grano, orzo, riso e mais. Oltre il 50% dei ceppi saggiati ha mostrato di produrre metaboliti capaci di inibire, in misura più o meno rilevante, la germinazione dei semi.

#### SUMMARY

The activity toward germination of wheat, red clover and watercress of culture filtrates of 297 fungal strains (representatives of 19 different genera), isolated from wheat, corn, rice and barley seeds, has been assayed. It has been shown that more than 50% of the strains tested produce metabolites that inhibit more or less strongly seed germination.

BIBLIOGRAFIA

- DICKINSON C.H. e G.J.F. PUGH - *The mycoflora associated with Halimione portulacoides. I. The establishment of root surface flora of mature plants.* Trans. Brit. Mycol. Soc., 48, 381-390 (1965).
- DOMSCH K.H. - *The action of physiologically active substances in the root region.* In: Plants-microbes Relationships. J. Macura e V. Vancura (Editori), 201-208 (1965).
- KATSKA V., MACURA J. e K. VAGNEROVA - *Rhizosphere microflora of wheat. III. Fungal flora of wheat rhizosphere.* Folia Microbiol., 5, 320-330 (1960).
- SCHOENTAL R. e A.F. WHITE - *Aflatoxin and « albinism » in plants.* Nature (London), 205, 57-58 (1965).
- VERONA O. - *Interrelazioni fra microrganismi e pianta.* Relazione generale a questo Colloquio.

ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA  
DELLA UNIVERSITÀ DI NAPOLI

S. COPPOLA - G. PERCUOCO - A. ZOINA - G. PICCI

ASPETTI MICROBIOLOGICI DEI DISTURBI  
DA REIMPIANTO DEL PESCO

2. Sostanze fitotossiche da estratti acquosi di radici di pesco e loro effetto sulla microflora terricola.

Nel corso di un precedente lavoro (17) è stata dimostrata l'azione fitotossica degli estratti acquosi di radici di pesco. Il frazionamento cromatografico degli estratti acquosi radicali aveva portato alla evidenziazione di otto componenti, tra i quali, alla prova biologica, tre hanno mostrato di possedere spiccata attività tossica. È stato inoltre dimostrato, mediante percolazione, il ruolo fondamentale che la microflora terricola esplica nella scomparsa di tale tossicità.

Con la presente nota si dà conto del prosieguo di tali indagini, miranti da un lato all'isolamento di forme microbiche interessate alla presenza ed al metabolismo delle fitotossine nel terreno, dall'altro ad indagare sulla natura chimica delle fitotossine stesse.

MATERIALI E METODI

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI RADICALI.

Gli estratti radicali sono stati ottenuti e sterilizzati come in precedenza (17).

SAGGI DI PERCOLAZIONE.

È stato impiegato il dispositivo di percolazione proposto da Naguib (15).

#### PROVE BIOLOGICHE DI FITOTOSSICITÀ.

Sono state effettuate secondo la tecnica descritta in precedenza (l.c.).

#### TERRENI COLTURALI.

A) Estratto di terra secondo WINOGRADSKY [POCHON e TARDIEUX (18)];

B) Estratto di terra preparato a freddo, sostituendo all'acqua l'estratto radicale di pesco.

Entrambi i terreni sono stati impiegati liquidi ed agarizzati.

#### ISOLAMENTO DEI CEPPI MICROBICI.

Terreni rizosferici di piante di pesco sane e affette da « stanchezza » e terreni di colonne di percolazione « attive », capaci cioè di far scomparire la tossicità degli estratti in breve tempo, sono stati piastrati secondo le solite metodologie sul substrato B agarizzato. Dopo 5 giorni di incubazione a 28° C sono stati isolati 153 ceppi.

#### IDENTIFICAZIONE DEI CEPPI.

I riferimenti tassonomici dei ceppi isolati, riportati a livello di genere, sono stati effettuati secondo il Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (3), determinando la mobilità ed il tipo di flagellazione delle cellule mediante osservazione al microscopio elettronico, dopo colorazione con acetato di uranile. Per la determinazione degli altri caratteri diagnostici sono state impiegate le metodiche tradizionali.

#### EFFETTO DELLE FITOTOSSINE SUI CEPPI ISOLATI.

È stato valutato in funzione del responso di crescita dei ceppi, presenti o meno le singole fitotossine in due diverse concentrazioni: una concentrazione pari a quella ricorrente negli estratti radicali, ed un'altra rispettivamente tripla. La crescita è stata valutata misurando, dopo 16 ore di incubazione a 28° C, la densità ottica della colture a 620 nm.

#### OTTENIMENTO DELLE FRAZIONI TOSSICHE.

Mediante separazione cromatografica su carta Whatman 3MM, secondo le modalità indicate nel precedente lavoro (17) e successiva eluzione con acqua a 4° C.

#### IDENTIFICAZIONE DELLE SOSTANZE TOSSICHE.

La sostanza con  $R_f$  minore (sostanza II nella precedente nota) è stata identificata come sostanza tannica applicando le reazioni caratteristiche dei tannini indicate da LONG (14):

- 1) precipitazione con soluzione di gelatina (1% in NaCl 10%);
  - 2) colorazione bleu o verde con soluzioni di sali ferrici (1% di allume ferrico in acqua o soluzione a 10% di  $FeCl_3$  in ambiente metanolico);
  - 3) precipitazione con soluzione di acetato di piombo (10% in acqua).
- Tecniche supplementari riguardanti lo studio della natura chimica di questa frazione tossica degli estratti radicali sono riportate con i risultati.

L'identificazione delle altre frazioni tossiche è stata eseguita fondamentalmente per spettrofotometria nell'infrarosso, con la collaborazione del Prof. FRANCESCO PALMIERI dell'Istituto di Chimica Agraria dell'Università di Napoli.

#### RISULTATI

##### EFFETTO DELLE FRAZIONI FITOTOSSICHE DEGLI ESTRATTI RADICALI SUI MICRORGANISMI ISOLATI.

Fra i microrganismi isolati germi appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Sarcina*, *Achromobacter* ed *Escherichia*, sono risultati i più rappresentati.

Una parte di essi inoltre ha mostrato di non essere influenzata nel suo livello di crescita dalle singole sostanze fitotossiche ottenute dagli estratti radicali di pesco. Un'altra parte ha mostrato invece di risentire variamente della presenza nel mezzo delle fitotossine, risultando sensibile anche alle loro diverse concentrazioni.

La fig. 1 riporta i responsi caratteristici di alcuni ceppi. In essa l'altezza delle colonnine rappresenta la densità ottica delle colture nelle diverse condizioni sperimentali rispetto a un controllo (coltura in estratto di terra senza fitotossine) fatto pari a 100. Le colonnine piene si riferiscono alla sostanza II, quelle vuote alla sostanza VII e quelle punteggiate alla VIII di cui alla precedente nota.

##### INDAGINI SULLA NATURA CHIMICA DELLE FITOTOSSINE.

L'identificazione della sostanza II come una sostanza tannica, ci ha indotto ad approfondire la nostra indagine sui costituenti tannici dell'e-

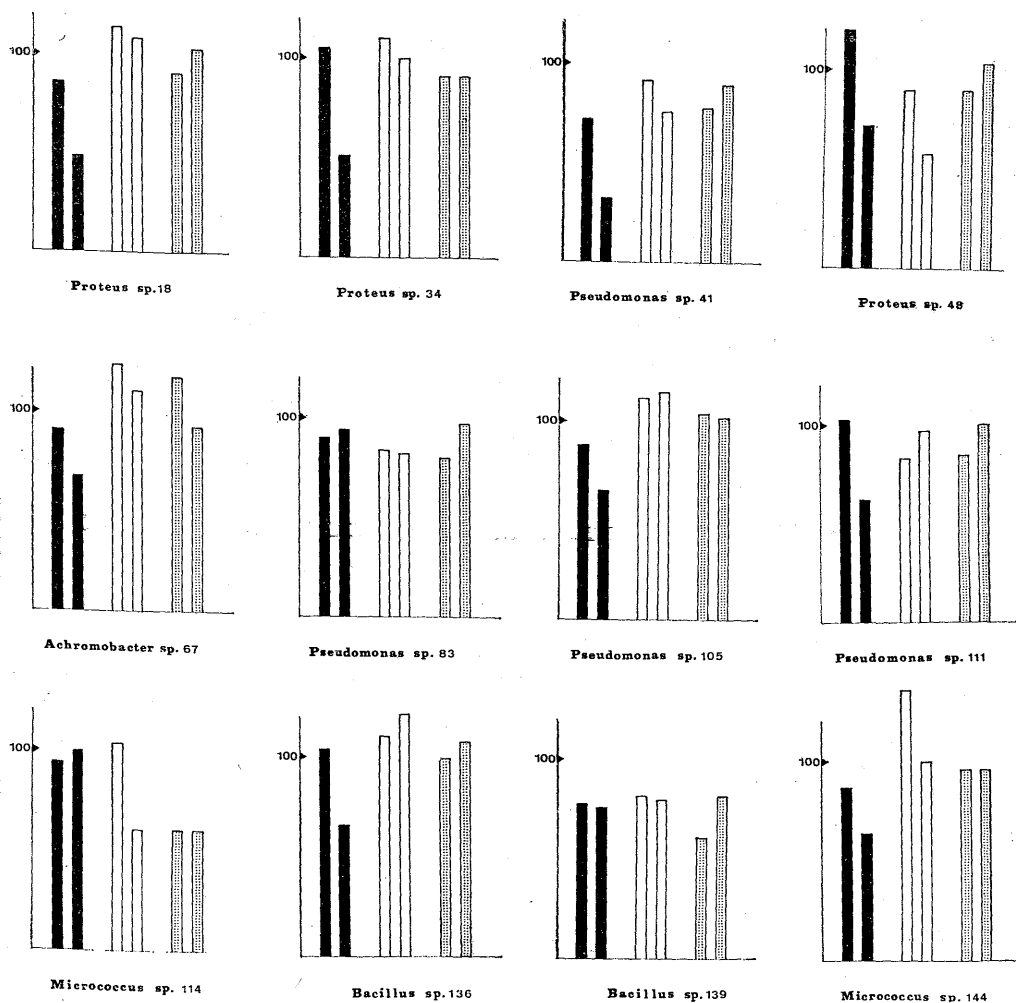


Fig. 1. - Responsi di accrescimento di ceppi batterici in presenza di fitotossine. Colonne piene: in presenza della sostanza II (sost. tannica); colonne bianche: in presenza della sostanza VII (derivato benzoico); colonne punteggiate: in presenza della sostanza VIII (derivato benzoico).

Di ciascuna coppia di colonne, la sinistra rappresenta la crescita in presenza della fitotossina in concentrazione uguale a quella degli estratti, la colonna di destra si riferisce all'accrescimento in presenza della stessa fitotossina in concentrazione tripla. Crescita del controllo (senza fitotossine) uguale a 100.



stratto acquoso radicale. Allo scopo è stato applicato il metodo di LONG (l.c.) per il recupero dei composti tannici: sono stati fatti assorbire gli estratti radicali su cellulosa Whatman in polvere per cromatografia, si è essiccato il tutto sotto vuoto a 40° C, sono stati eluiti i tannini con acetone acquoso (1:1, v/v). Dopo allontanamento dell'acetone sotto vuoto in evaporatore rotante, al residuo acquoso è stata applicata la tecnica di frazionamento dei tannini indicata da SCHMIDT (19). Dopo aver portato pertanto il pH a 6,0 ÷ 6,3, si è proceduto ad estrazione continua, per 8 ore, con acetato di etile in estrattore liquido-liquido Quikfit. L'estratto contenente i tannini idrolizzabili « carboxy-free », veniva separato. Si procedeva quindi a correzione del pH a 2,0 ÷ 2,5 della fase acquosa e ad ulteriore estrazione con acetato d'etile, separando in tal modo i tannini idrolizzabili carbossilici nella fase organica, dai tannini condensati nella fase acquosa. Alle tre frazioni così ottenute sono state applicate le reazioni caratteristiche dei tannini già indicate, ed inoltre le reazioni di gruppo indicate da GNAMM (6) per distinguere i tannini idrolizzabili da quelli condensati: la reazione con formaldeide-HCl, che, dopo trattamento a caldo (ebollizione) per 30 minuti, consente di separare i tannini condensati e di evidenziare quelli idrolizzabili con acetato di sodio e allume ferrico, ottenendo colorazione bleu e violetta; la reazione con acetato di piombo in presenza di acido acetico, che previene la precipitazione dei tannini condensati, ma non quella degli idrolizzabili; la reazione infine con solfuro d'ammonio, che dà un precipitato coi tannini idrolizzabili, ma non coi condensati.

Dalla applicazione di queste tecniche, negli estratti radicali tossici del pesco, sarebbero quindi presenti tannini idrolizzabili del tipo « carboxy-free » e tannini condensati. Questi ultimi inoltre sono risultati essere costituiti esclusivamente da tannini catechinici derivati dal flavano, in quanto il loro spettro di assorbimento in etanolo mostrava un massimo a 277 nm (vedi fig. 2), escludendo la presenza di derivati dello stilbene, caratterizzati da un  $\lambda_{\max}$  a 325 nm.

La prova di tossicità ha accertato che entrambe le frazioni tanniche ottenute sono fitotossiche: la prima infatti inibisce completamente la germinazione dei semi di lattuga, mentre la seconda ostacola lo sviluppo embrionale e provoca necrosi degli apici radicali (come appare nella figura 3).

Per quanto riguarda le due frazioni tossiche indicate come VII e VIII, l'esame degli spettri IR e UV ha rilevato caratteristiche che suggeriscono la presenza di strutture tipiche di derivati dell'acido benzoico.

Il ruolo di questi composti nei problemi relativi alla malattia specifica

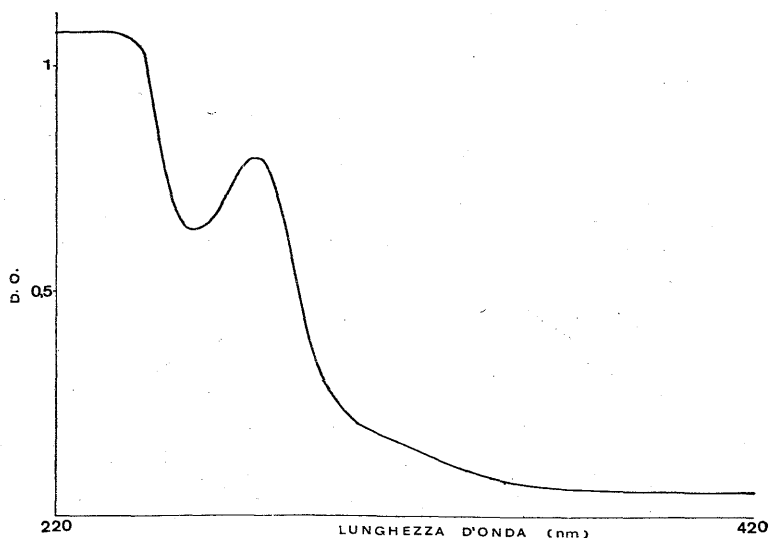


Fig. 2. - Spettro di assorbimento in etanolo dei tannini condensati presenti nell'estratto acquoso radicale di pesco.

da reimpianto del pesco è stato ampiamente studiato da PATRICK (16). Pertanto non abbiamo ritenuto opportuno, al momento attuale, approfondire ulteriormente le nostre indagini su queste due frazioni.

#### CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Risulta quindi confermato che le fitotossine presenti negli estratti acquosi di radici di pesco possono essere demolite o comunque trasformate ad opera della microflora del suolo. I microrganismi interessati a tale processo non si comportano però uniformemente rispetto alle singole fitotossine: sono stati infatti rilevati, variamente assortiti, responsi di stimolo, di inibizione e di indifferenza, concorrendo, l'insieme dei dati raccolti, ad avvalorare l'ipotesi che, nel terreno, la demolizione delle tossine prodotte dal pesco sia operata da una microflora varia, opportunamente assortita sia in termini sistematici che funzionali e che la velocità di tale processo demolitivo sia funzione dell'efficacia di questa metabiosi, anche in rapporto a fattori ambientali. Nessun ceppo infatti di quelli da noi isolati da *habitat* tipicamente ed intensamente interessati alla trasformazione delle fitotossine, si è mostrato in grado di impiegare favorevolmente per il pro-

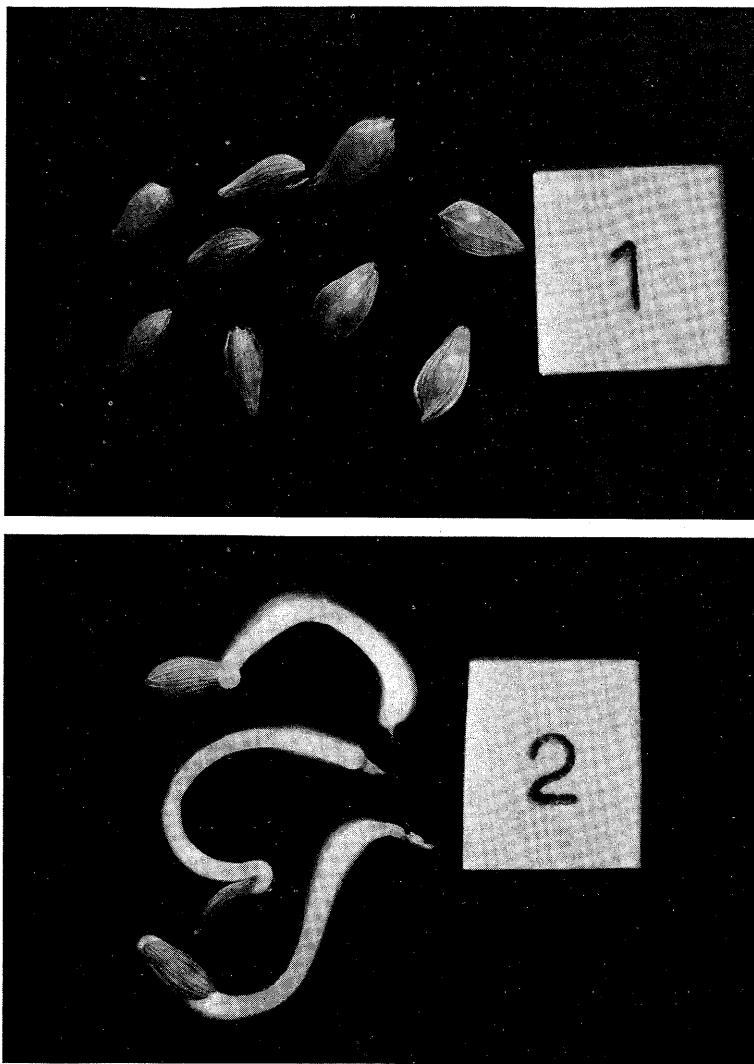


Fig. 3. - Effetto delle sostanze tanniche degli estratti radicali di pesco sulla germinazione dei semi di lattuga Trocadero.  
1: frazione di tannini idrolizzabili; 2: frazione di tannini condensati.

prio sviluppo tutte e tre le sostanze tossiche da noi rinvenute ed isolate. D'altra parte il responso di indifferenza evidenziato a carico di taluni ceppi completa il quadro delle possibili reazioni della microflora terricola alle fitotossine, senza peraltro consentire di escludere una possibile loro partecipazione al processo in questione.

Per quanto concerne l'aspetto chimico della ricerca, ci sembra degna di nota la dimostrata fitotossicità delle componenti tanniche degli estratti radicali. Infatti fino ad oggi l'azione tossica degli estratti stessi veniva attribuita ai prodotti di demolizione della amgdalina: benzaldeide e acido cianidrico (16).

Lo stato attuale delle nostre conoscenze sulla fitotossicità dei tannini e sulla loro demolizione microbica è però piuttosto modesto. È noto peraltro che l'acido gallico — normale prodotto d'idrolisi dei tannini idrolizzabili — è un inibitore della deidrossiscichimico riduttasi dei germinelli di pisello ed è quindi possibile che l'acido gallico inibisca la produzione dell'acido scichimico e dei suoi derivati. La fitotossicità dei tannini condensati è stata dimostrata per quelli contenuti nelle foglie e nella lettiera di ginepro e l'azione tossica sarebbe da attribuire a monomeri e polimeri di leucoantocianidina e catechina (7-11).

I risultati da noi ottenuti confermano pienamente la fitotossicità dei tannini, sia di quelli idrolizzabili che di quelli condensati. Lo sviluppo di alcuni microrganismi a spese dei tannini è una dimostrazione — anche se indiretta — della demolizione di queste sostanze. Per quel che ne sappiamo soprattutto alcune specie di *Aspergillus* e *Penicillium* sono interessate alla demolizione dei tannini idrolizzabili (15) (4) (13) (1) (12), mentre *Penicillium solitum* (2), *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penic. janthinellum*, *Fusarium sp.* e *Pseudomonas sp.* sono responsabili della demolizione di catechina (12).

Il rinvenimento delle sostanze tanniche quali parziali responsabili della fitotossicità degli estratti radicali di pesco e l'isolamento di microrganismi in grado di utilizzare queste sostanze per il loro sviluppo, aprono nuove ed interessanti prospettive alle nostre indagini future, che riguarderanno il metabolismo dei tannini nel suolo in rapporto alla malattia specifica da reimpianto del pesco.

#### RINGRAZIAMENTI

*Gli Autori ringraziano il Prof. Francesco Palmieri per la cortese ed utile collaborazione prestataci. Ringraziamenti sono rivolti anche al Prof.*

Paolo Pizzolongo, Direttore del Centro di Microscopia Elettronica del C.N.R. presso la Facoltà di Agraria di Portici per aver concesso l'uso del microscopio.

#### RIASSUNTO

La tossicità degli estratti acquosi di radici di pesco è risultata dovuta a derivati dell'acido benzoico, a tannini idrolizzabili ed a tannini condensati.

Varî ceppi di microrganismi del suolo interessati all'attacco di tali sostanze sono stati isolati.

È stato altresì studiato il loro responso di crescita in funzione della presenza delle fitotossine prodotte dal pesco.

#### SUMMARY

The toxicity of aqueous extracts from peach roots resulted to be due to benzoic acid derivatives and to hydrolyzable and condensed tannins.

Various strains of soil microorganisms, which seem to be involved in the decomposition of such substances have been isolated.

Furthermore their growth response to peach toxins has been studied.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) BEVERIDGE E.G. e W.B. HUGO - *The metabolism of gallic acid by Pseudomonas convexa*. Appl. Bacteriol., vol. 27, 448 (1964).
- (2) BOKADIA M.M., B.R. BROWN e G.A. SOMERFIELD - *The relative conformation of catechin and epicatechin*. Proc. Chem. Soc., 280 (1960).
- (3) BREED R.S., E.G.D. MURRAY e N.R. SMITH - *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William & Wilkins Co. ed. (1957).
- (4) COWLEY G.T. e W.F. WITTINGHAM - *The effect of tannin on the growth of selected soil microfungi in culture*. Micologia, 53, 539 (1961).
- (5) FRIDRICH H. - *Der Abbau von phenolischen Substanzen durch Aspergillus niger*. Arch. f. Mikrobiol., 25, 297 (1956).
- (6) GNAMM (1949), in LONG C. (1961).
- (7) JAMESON D.A. - *Growth inhibitors in native plants of northern Arizona*. U.S. Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Exp. Sta. Res., Note, 61, 2 (1961).
- (8) JAMESON D.A. - *Pinyon-juniper litter inhibes growth of blue grama*. J. Range Manag., 19, 214 (1966).
- (9) JAMESON D.A. - *Species interactions of growth inhibitors in native plants of northern Arizona*. U.S. Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Exp. Sta. Res., Note RM-113 (1968).
- (10) JAMESON D.A. - *Herbage production differs with soil in pinyon-juniper test of*

Arizona. U.S. Forest Service, Rocky Mountain Forest Range Exp. Sta. Res., Note RM-131 (1969).

- (11) JAMESON D.A. - *Degradation and accumulation of inhibitors substances from Juniperus octiosperma (Torr.) Little*. Plant and Soil, 33, 213 (1970).
- (12) LEWIS J.A. e R.L. STARKEY - *Decomposition of plant tannins by some soil microorganissms*. Soil Sci., 107, 235 (1969).
- (13) LIPPTSCH M. - *Untersuchungen uber tannase bei Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol., 39, 209 (1961).
- (14) LONG C. - *Biochemist's Handbook*. E. & F.N. Spon Ltd. (1961).
- (15) NAGUIB A.I. - *A simple percolation apparatus*. Biologie du sol, 5, 41 (1966).
- (16) PATRICK Z.A. - *The peach replant problem in Ontario. II. Toxic substance from microbial decomposition products of peach root residues*. Can. J. Bot., 33, 461 (1955).
- (17) PICCI G., S. COPPOLA, G. PERCUOCO e A. ZOINA - *Aspetti microbiologici dei disturbi da reimpianto del pesco. I. Influenza della flora microbica terricola sugli estratti acquosi di radici*. Agricol. Ital., 26, 266 (1971).
- (18) POCHON J. e P. TARDIEUX - *Techniques d'analyse en Microbiologie du sol*. Ed. de La Tourelle (1962).
- (19) SCHMIDT (1955, 1956), in LONG (1961).

CENTRO DI STUDIO DEI MICRORGANISMI AUTOTROFI DEL C.N.R.  
PRESSO L'ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELLA UNIVERSITÀ DI FIRENZE

*Direttore:* Prof. GINO FLORENZANO

W. BALLONI - M. R. CELESTRE - F. FAVILLI - M. C. MARGHERI

INFLUENZA DELLA ALGALIZZAZIONE  
SULLA CRESCITA DELLA FRAGOLA IN COLTURA IDROPONICA

La particolare natura del mezzo idroponico quale substrato di attività microbiche è stata da tempo posta in evidenza, fra gli altri, da VERONA (1961) e da BANFI (1971). Ci limiteremo ad osservare che i sistemi di coltura senza suolo sono particolarmente adatti per lo studio delle influenze di determinate forme microbiche, innestate nel sistema secondo la pratica che VERONA (log. it.) ha indicato come « batterizzazione controllata », sulla crescita vegetale.

Noi abbiamo intrapreso delle indagini sugli effetti esercitati dalla inoculazione di microalghe, pratica questa denominata « algalizzazione » (VENKATARAMAN, 1961), su colture idroponiche di fragola.

Le esperienze, effettuate presso l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma, hanno riguardato l'algalizzazione con una cianoficea azotofissatrice, *Anabaena cylindrica*. I risultati di queste ricerche, intese soprattutto a definire l'influenza dell'alga azotofissatrice sul bilancio azotato della coltura idroponica di fragola, sono in corso di pubblicazione (BALLONI, CELESTRE e FAVILLI, 1972). In questa nota vengono invece brevemente esposte le considerazioni in ordine alla natura delle influenze che l'alga inoculata è in grado di esercitare sulla crescita della pianta.

MATERIALI E METODI

Le esperienze di algalizzazione sono state effettuate in un impianto di coltura idroponica contenuto in una serra dell'Istituto Sperimentale di Frutticoltura, composto da 12 vasche.

La biomassa di *Anabaena cylindrica* ceppo 82 necessaria alle inoculazioni è stata prodotta nell'impianto pilota del Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi di Firenze. Nelle esperienze venne usata la cultivar di fragola « Cambridge Favourite 422 » (densità di 18 piante/m<sup>2</sup>).

L'algalizzazione venne effettuata all'inizio del ciclo vegetativo con tre aggiunte, distanziate di circa 30 giorni l'una dall'altra, di biomassa di *A. cylindrica* alle soluzioni di coltura in ragione di circa 100 mg di sostanza secca/litro di soluzione. Una quarta aggiunta venne effettuata alla ripresa vegetativa del secondo anno.

Durante l'intero ciclo vegetativo della fragola per due anni consecutivi furono seguite le variazioni nelle condizioni microbiologiche del sistema idroponico assieme allo sviluppo ed alla resa delle piante. I dettagli dei metodi di conduzione della coltura idroponica e di indagini microbiologica sono esposti nei lavori di BALLONI e CELESTRE (1970) e di BALLONI, CELESTRE e FAVILLI (1972).

Le esperienze di algalizzazione furono condotte su tre prove, differenti fra loro per la quantità di azoto combinato nella soluzione nutritiva (tesi A = quantità normale di azoto; tesi B = azoto ridotto alla metà; tesi C = senza azoto combinato).

#### RISULTATI SPERIMENTALI

Un aspetto emerso dalle nostre ricerche, e che ci sembra opportuno definire in via preliminare, riguarda la localizzazione della microflora del sistema idroponico studiato. A tale riguardo abbiamo riscontrato che, mentre in partenza la carica microbica delle soluzioni e del supporto (costituito da selce leucitica) sono pressoché identiche, con il passare del tempo si osserva che la microflora diviene più abbondante sul supporto che non nelle soluzioni.

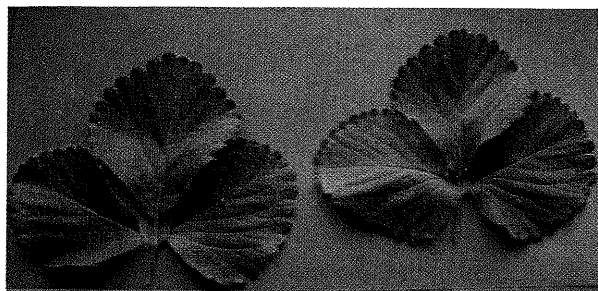
I dati della Tabella 1 mostrano che già dopo 55 giorni di coltura il supporto presenta una carica microbica più elevata, di quella delle soluzioni. In seguito questa differenza tende ad accentuarsi, poiché ad un progressivo aumento della densità microbica del supporto fa riscontro un incremento più modesto nelle soluzioni.

La localizzazione preferenziale dei microrganismi sul supporto, che trova una spiegazione nella ben nota tendenza di molte forme microbiche ad aderire a substrati solidi (MEADOWS, 1971), è un fatto di basilare importanza ai fini della scelta delle tecniche di studio della microflora dei sistemi idroponici e per una corretta comprensione del modo in cui si for-

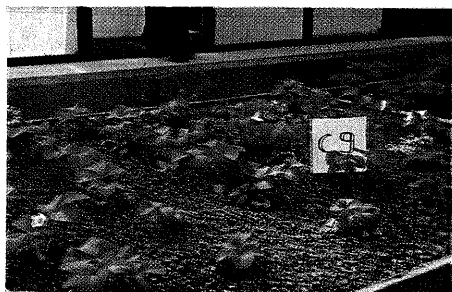




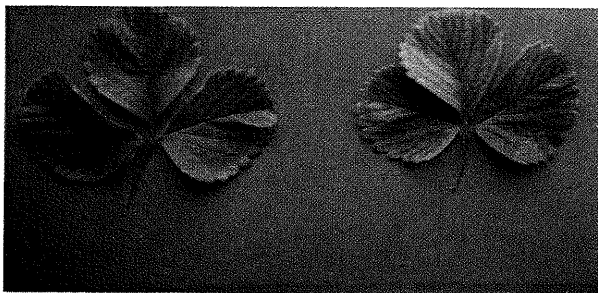
1



2



3



4

Influenza dell'algalizzazione sulla crescita della fragola varietà Cambridge Favourite in idroponica:

1 - 2 Sviluppo delle piante e relative foglie in soluzione nutritiva senza azoto, inoculata con *Anabaena cylindrica*;

3 - 4 idem, ma non algalizzate.

ma ed agisce la biocenosi di questi sistemi. In definitiva, se il substrato viene considerato, a ragione, chimicamente inerte, esso diviene abbastanza presto biologicamente attivo.

Anche l'alga inoculata nella soluzione nutritiva tende a fissarsi al supporto solido, tanto che dopo 3 o 4 subirrigazioni l'80-90% dei tricoli dell'alga scompare dalla soluzione e si ritrova aderente alla superficie dei granelli di selce leucitica. Questo comportamento dell'alga rappresenta la chiave per interpretare gli effetti da essa esercitati sulla pianta e sulla microflora.

Tab. 1. - Caratteristiche microbiologiche delle soluzioni nutritive e dei supporti prelevati all'epoca dell'incipiente fruttificazione (dati espressi come numero/g di supporto o per ml di soluzione  $\times 10^6$ ).

	Prove					
	A		B		C	
	SN <sup>(1)</sup>	SU <sup>(2)</sup>	SN	SU	SN	SU
Carica microbica totale	8,3	21	5,8	9,0	2,2	7,0
Eumiceti	2,0	5,0	0,7	1,5	0,2	0,3
Alghe	1,0	1,1	1,2	1,5	0,02	0,4
Ammonizzanti	0,1	0,4	0,2	0,6	0,06	0,1
Denitrificanti	0,4	0,5	0,3	0,6	0,06	0,1
Azotobacter <sup>(3)</sup>	0	0	0	0,03	0,1	0,5

(<sup>1</sup>) SN = Soluzione nutritiva.

(<sup>2</sup>) SU = supporto.

(<sup>3</sup>) I dati si riferiscono al prelievo finale della esperienza.

Per quanto riguarda la microflora, l'algalizzazione ha prodotto un generale, anche se non elevato, incremento, tanto nella carica totale quanto nei gruppi esaminati. Tale effetto deve essere attribuito in gran parte alla aumentata disponibilità di materia organica rappresentata dalla stessa biomassa algale e dai prodotti del suo metabolismo.

Nella tabella 2 sono esposti alcuni dei dati ottenuti, dai quali si può dedurre l'entità della azione di stimolo esercitata dalla algalizzazione sulla microflora. Tali dati si riferiscono alla tesi A (soluzione minerale completa).

Più interessanti risultarono gli effetti della algalizzazione sulla crescita

e sulla fruttificazione della fragola, effetti che possono essere così riassunti:

- (1) - a 30 giorni dall'impianto della coltura e dopo 15 giorni dalla prima somministrazione di alghe, lo sviluppo delle piantine algalizzate è del 10-20% superiore a quello delle piantine testimoni;
- (2) - una più abbondante fioritura, che supera quella delle piante testimoni in misura del 25%;
- (3) - una più abbondante produzione di frutti sia come numero sia come dimensioni;
- (4) - un contenuto in N, P e K generalmente superiore;
- (5) - l'esame delle piantine dopo estirpamento ha mostrato che le piante algalizzate posseggono un apparato radicale più sviluppato, dovuto soprattutto all'aumento del numero di radici prodotte da ciascuna pianta.

Tab. 2. - Effetto della algalizzazione con *Anabaena cylindrica* sulla quantità di microrganismi presenti nella coltura idroponica di fragola all'epoca della raccolta dei frutti (cellule/g di supporto o ml di soluzione  $\times 10^5$ )<sup>(1)</sup>.

	Testimone		Algalizzato	
	SN	SU	SN	SU
Carica microbica totale	18	35	120	240
Eumiceti	12	50	90	200
Alghe	1,5	1,4	15	130
Ammonizzanti	3	8	8	40
Denitrificanti	50	80	95	180

<sup>(1)</sup> Per i simboli vedasi la tabella 1.

Se il verificarsi degli effetti sopra elencati può essere attribuito, nel caso della tesi C, senza azoto, alla migliorata disponibilità di questo elemento conseguente all'apporto della azotofissazione algale, il fatto che essi si siano manifestati anche nelle tesi con azoto combinato mostra che l'alga ha avuto un effetto stimolante sulla pianta che non ha alcun rapporto con la disponibilità azotata. La produzione di sostanze bioattive da parte dell'alga, o di qualche altro componente della microflora stimolato dalla algalizzazione, può essere il meccanismo responsabile. L'effetto rizogeno conseguente alla algalizzazione fa pensare a fatti di tal genere.

L'algalizzazione con cianoficee sembra abbia effetti favorevoli non

solo nelle condizioni della coltura idroponica, ma anche nel suolo. Infatti DADHICK e coll. (1969) hanno riscontrato che la somministrazione di urea accoppiata all'inoculazione con *Calothrix anomala*, stimola la crescita di alcune piante ortive coltivate in vasi, maggiormente che non la sola somministrazione di urea. Fatti analoghi sono stati osservati nel nostro Istituto sperimentando, in vasi e in pieno campo, l'effetto della inoculazione di *Anabaena cylindrica* su alcune specie foraggere graminacee e leguminose.

#### CONCLUSIONI

Le colture idroponiche costituiscono un sistema particolarmente adatto per indagare taluni aspetti delle influenze reciproche fra piante e microrganismi a livello radicale.

La algalizzazione con *Anabaena cylindrica* di colture idroponiche di fragola ha avuto un effetto stimolante sulla crescita della pianta che non può essere spiegato chiamando in causa l'attività azotofissatrice, poiché esso si è manifestato anche in condizioni di ampia disponibilità di azoto combinato.

Mentre le ricerche in corso mirano a definire l'origine ed il meccanismo dell'effetto osservato, si deve fin d'ora rilevare che, anche in condizioni di nutrizione minerale adeguate ai bisogni della pianta, i microrganismi possono esplicare azioni benefiche sullo sviluppo e sulla resa delle colture, azioni che è interessante conoscere e definire.

#### RIASSUNTO

È stata accertata l'influenza positiva dell'algalizzazione, con *Anabaena cylindrica*, sulla crescita e sulla produzione di piante di fragola della var. Cambridge in coltura idroponica.

#### SUMMARY

The authors refer the results of greenhouse experiments, in which soilless cultures of strawberry (variety Cambridge Favourite 422) has been inoculated with *Anabaena cylindrica*. It has been shown that algalization have a favourable effect on the growth and yield of the plant.

BIBLIOGRAFIA

- BALLONI W. e M.R. CELESTRE - *Indagini microbiologiche sulle colture idroponiche di fragola. Microflora e nutrizione minerale della fragola in coltura idroponica.* Ann. Ist. Sperim. Frutt., 1, 33-47 (1970).
- BALLONI M., CELESTRE M.R. e F. FAVILLI - *Esperienze di algalizzazione in idroponica di fragola: effetti sulla microflora e sulla crescita della pianta* - L'Italia Agricola 109, n. 9 (1972).
- BANFI G. - *Microbiologia delle colture idroponiche.* Agricoltura, XX, 32-40 (settembre 1971).
- DADHICH K.S., VARNA A.K. e G.S. VENKATARAMAN - *The effect of Calothrix inoculation on vegetable crops.* Plant and Soil, 31, 377-379 (1969).
- MEADOWS P.S. - *The attachment of bacteria to solid surfaces.* Arch. Mikrobiol. 75, 374-381 (1971).
- VERONA O. - *Problemi microbiologici delle colture idroponiche.* L'Agricol. Ital. LXI (XVI N.S.), 339-345 (1961).

## DISCUSSIONE

Prof. BANFI

Al Prof. BALLONI, a proposito della sua interessante relazione, vorrei chiedere quale sistema di alimentazione veniva adottato per le vasche di coltura di fragola e se per subirrigazione, entro limiti di profondità dalla superficie del substrato solido si poteva verificare una distribuzione di alghe.

Richiamandomi alla migliore produttività della fragola, desidererei conoscere se si sia potuto accertare che tale comportamento dipenda da quei determinati tipi di alghe presenti, oggetto di studio e se l'attività vegetativa delle piantine di fragola possa, per alcuni aspetti, essere influenzata anche dalla presenza di altri tipi di alghe verdi, comprese pure quelle che più frequentemente e spontaneamente compaiono a costituire feltri superficiali nei substrati idroponici. Principi di tecnica colturale tradizionale suggerivano di adottare mezzi opportuni per evitare la formazione di detti feltri, ritenuti soprattutto dannosi per processi competitivi nei riguardi del metabolismo degli scambi gassosi.

Prof. CARILLI

Vorrei domandare alla Sig.ra CORBERI, che ha riferito sulla attività di parassitismo da parte di *Bdellovibrio* in microrganismi gram negativi, se questa è una limitazione della specie o del ceppo saggiato, oppure se non è stato ancora osservato qualcosa di analogo anche per i batteri gram positivi; e in questo caso, se il fenomeno può essere messo in relazione con quanto riferito dal Prof. FLORENZANO sulla differenza nel contenuto delle membrane fra batteri gram positivi e batteri gram negativi. Nel caso sia possibile mettere in evidenza anche un parassitismo in germi gram positivi, potrebbe essere interessante per esempio saggiare la possibilità di liberare con questo mezzo il cristallo proteico del *Bacillus thuringiensis*, contenuto all'interno della cellula batterica in posizione opposta a quella della spora. Potrebbe risultare, questo, un metodo di grande interesse pratico, dal momento che le tecniche attualmente sviluppate e disponibili per separare i cristalli della tossina entomogena non sono del tutto soddisfacenti.

Volevo domandare al Prof. BALLONI, in relazione a quanto ci ha riferito sulla tecnica della algalizzazione mediante alghe azotofissatrici, se si tiene conto del fatto che le alghe da una parte cedono ossigeno e dall'altra, a loro volta, ne determinano un consumo notevole, in quanto alla fine del loro ciclo vitale vengono degradate mediante processi di ossidazione a carico di batteri. Ed il fatto che nelle parcelle trattate con tali alghe si ritrova una carica batterica sette volte maggiore di quella del controllo sta a dimostrarlo; ciò spiega anche bene perché questi liquidi risultano più ricchi di azoto, che evidentemente proviene tanto dal decadimento della coltura algale quanto da quello delle stesse cellule batteriche.

Vorrei, infine chiedere alla Dr.ssa TOMASELLI se, avendo osservato che la maggior parte dei ceppi fungini saggiati nelle sue esperienze risultavano attivi contro la germinazione dei semi, ha potuto mettere in evidenza una eventuale produzione da parte di tali colture di acido micofenolico, sostanza comunemente prodotta da Penicilli ed Aspergilli, che sembra avere attività antimicotica oltre che antivirale. Grazie.

Vorrei aggiungere qualche altro esempio di studi sulle interazioni fra metaboliti fungini e piante; e sono particolarmente lieto di cogliere questa opportunità, perché in effetti si tratta di esempi significativi delle possibilità che si offrono anche nel nostro Paese in questo settore, che è squisitamente interdisciplinare. Come tale, infatti, questo comparto delle discipline biologiche richiederebbe per molte delle sue ricerche un tipo di approccio particolarmente efficace — e diciamo pure più moderno — che implica l'applicazione di più ricercatori appartenenti a distinte discipline, anche non biologiche; come appunto è il caso degli esempi che desidero ricordare. Una maggior diffusione di questo tipo di approccio interdisciplinare è senz'altro desiderabile ed è stato anche auspicato nel corso di questo Convegno, credo da parte del Prof. BANFI.

Dunque, gli esempi sono quelli dell'ottenimento e della caratterizzazione chimica di alcuni metaboliti fungini — le cochlioboline dell' *Elminthosporium oryzae* e la fusicoccina del *Fusicoccum amygdali* — entrambi funghi fitopatogeni che sono causa di estese malattie in importanti raccolti. Entrambe queste ricerche sono state condotte in stretta e cordiale collaborazione tra l'Impianto pilota per la chimica microbiologica dell'Istituto Superiore di Sanità che io dirigo, e — rispettivamente — l'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica della Università di Milano diretto dal Prof. TRECCANI, e l'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Bari diretto dal Prof. CICCARONE.

Nel primo caso — cochlioboline — si è trattato di sostanze terpenoidi di tipo nuovo, derivanti dalla condensazione di 5 unità isopreniche unite

linearmente testa e coda. Nel secondo caso — fusicoccina — si è trattato di un particolare glucoside che presenta azione fitotossica a livelli di concentrazione molto bassi (0,2µg/ml). L'azione di questa ultima sostanza induce cambiamenti nel bilancio idrico e nella traspirazione delle piante trattate, facendone pertanto intravedere anche interessanti impieghi pratici (ad esempio, nell'essiccazione delle foglie di tabacco, del foraggio, ecc.). Contemporaneamente, e a dosi opportune, la fusicoccina ha anche mostrato di indurre un rimarchevole aumento nel peso fresco della pianta, allungamento dei segmenti internodali in piante di pisello eziolate ed un aumento della plasticità cellulare: e questi sono effetti tipici delle auxine.

In entrambi i casi, comunque, si è trattato di ottenere quantità notevoli di metabolita (qualche Kg in un caso e alcune centinaia di grammi nell'altro), il che richiede la disponibilità di un grande impianto pilota per fermentazioni, la messa a punto delle tecnologie microbiologiche e chimiche per la produzione, l'estrazione e la purificazione del prodotto, in quantità sufficienti per consentire non solo la sua caratterizzazione chimica ma soprattutto la sua sperimentazione successiva, nella scala più ampia possibile.

Esempi come questi, di così efficace collaborazione interdisciplinare nello studio di fitotossine fungine, sono diventati anche una specie di esercizio elegante — se non sofisticato — nella chimica di prodotti naturali biologicamente attivi, da cui tuttavia è lecito aspettarsi l'individuazione di sempre nuove sostanze, di grande interesse tanto scientifico che pratico. Grazie.

Prof. LEPIDI

Una domanda a BALLONI. Se ho ben capito quello che hai detto, ad un certo punto si verifica, dopo un certo tempo di coltura idroponica in quelle date condizioni, un aumento notevole della microflora aderente ai granelli del supporto inerte. Mi pare però che il tempo di mantenimento delle prove è stato molto lungo. Non so quindi se una spiegazione possibile dell'aumento riscontrato nella microflora sia questa: ad un certo punto a seguito della formazione di un sia pure piccolissimo strato di sostanza organica, di prodotti umificati ecc. anche in piccola quantità, attorno a questi granelli si ha un processo di neopedogenesi. Praticamente il confronto alla fine viene fatto tra un incipiente profilo di terreno e un liquido percolante. E questo potrebbe spiegare le differenze trovate. Ti domando se questo processo così delineato sia plausibile alla luce delle tue esperienze.



Prof.ssa CORBERI

I microrganismi attaccati sono di solito Gram negativi; i batteri Gram positivi segnalati nella letteratura come suscettibili d'essere parassitati sono solamente due: è comunque da notare che non tutti i Gram negativi possono essere predati. Non mi risulta, inoltre, che siano state eseguite ricerche su pareti di batteri Gram positivi o negativi nei riguardi dell'attacco parassitico.

Dott.ssa TOMASELLI

In risposta alla domanda del Prof. CARILLI debbo precisare che, essendo lo scopo della nostra indagine quello di stabilire la incidenza, nell'ambito della microflora dei semi di talune piante, di ceppi capaci di inibire la germinazione, ci siamo trovati nella necessità di saggiare un gran numero di colture eumicetiche (297). Pertanto, in questa prima fase della ricerca abbiamo dovuto limitare la nostra indagine alla determinazione, mediante un saggio di semplice e rapida esecuzione, della capacità dei ceppi eumicetici ad esercitare azione inibitrice. La determinazione del tipo di principio inibitore prodotto dai funghi riscontrati attivi rappresenta necessariamente una fase successiva della ricerca, che si ha in programma di intraprendere quanto prima.

Prof. BALLONI

Rispondo al Prof. BANFI ringraziandolo per le domande. Le colture idroponiche sono state alimentate per subirrigazione. Per quanto riguarda il secondo quesito, sulla scorta dei risultati ottenuti dalle nostre esperienze posso precisare che la presenza delle alghe nel supporto non è limitata alla superficie, ma si estende anche in profondità fino ad interessare, anche se con concentrazioni inferiori, tutto il substrato idroponico. La riciclaggio della soluzione nutritiva favorisce questa distribuzione.

Le microalghe verdi riscontrate appartengono prevalentemente ai generi *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum* ed *Hormidium*. Quest'ultima alga filamentosa tende a formare un velo sulla superficie delle soluzioni nutritive nei recipienti di raccolta. Le alghe verdi-azzurre sono quelle dei generi *Oscillatoria* e *Lyngbya*, mentre scarse ed incostanti sono state riscontrate quelle azotofissatrici dei generi *Nostoc* ed *Anabaena*.

Infine, per quanto concerne la eventuale influenza del tipo di alga sulla produttività della fragola, si può osservare che la componente algale della microflora delle idroponiche, considerata fino ad oggi indesiderabile,

va invece rivalutata sulla scorta dei risultati delle presenti ricerche, in analogia a quanto si riscontra sul ruolo delle alghe inoculate in risaia.

A parte il caso specifico delle alghe azotofissatrici che sono in grado di contribuire in maniera efficace alla nutrizione azotata delle piante di fragola, da un punto di vista generale si può asserire che anche le microalghe verdi, naturalmente insediate, esercitano influenza favorevole sull'equilibrio microbiologico delle colture idroponiche, sia per attivazione dei principali gruppi fisiologici di microrganismi del ciclo del carbonio e dell'azoto, sia per lo stimolo sulla microflora azotofissatrice eterotrofa. Infine, alla componente algale, come è stato riscontrato da alcuni AA. e da noi, sono probabilmente da attribuire gli effetti favorevoli sulla crescita e la produttività delle piante a seguito della produzione di sostanze bioattive da parte dell'alga inoculata o di qualche componente della microflora stimolata dalla presenza di essa.

Ringrazio il Prof. CARILLI per i suoi interessanti quesiti. Sono d'accordo sui concetti esposti nella prima parte del suo intervento, ma vorrei sottolineare il fatto che l'algalizzazione non è apporto di sostanza organica, ma innesto di organismi vivi, che colonizzano e danno luogo a formazione di materia organica viva e capace di incrementare lo sviluppo degli altri gruppi microbici e solo in tal senso capace di assumere un ruolo molto importante nella colonizzazione microbica del supporto. Le alghe si sviluppano su di esso, attraverso un fitto intreccio di filamenti algali a guisa di manicotto, facendolo divenire, benché chimicamente inerte, centro di attività microbiologiche che ricordano, nelle linee essenziali, i processi biologici del suolo.

Rispondo brevemente al Prof. LEPIDI, ringraziandolo per la domanda. Un processo di neopedogenesi a carico del supporto inerte di una coltura idroponica, può a lungo andare probabilmente verificarsi in conseguenza della colonizzazione prodotta dalla algalizzazione. Tuttavia l'arco di tempo dell'esperimento riferito nella mia comunicazione è evidentemente troppo piccolo perché si possa parlare di tali processi.

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELL'UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

M. FAVALORO - G. SAMMARCO

RICERCHE SULLA MICROFLORA DELLA RIZOSFERA  
DEGLI AGRUMI IN SICILIA

Risultati di analisi quantitative  
in rapporto allo stato vegetativo delle radici

La popolazione microbica della zona di terreno a contatto con le radici delle piante o comunque sotto la loro influenza è quantitativamente e qualitativamente differente da quella del terreno libero. Tale fenomeno si spiega con le interazioni che si stabiliscono tra le radici e la microflora del terreno e che comunemente viene chiamato « effetto rizosfera ».

La zona di influenza delle radici, denominata da HILTNER (1904) « rizosfera », negli ultimi vent'anni è stata studiata con sempre maggiore impegno, riconoscendo a tale regione una grande importanza per la nutrizione, la crescita e la sanità della pianta; oggi, quindi, il fenomeno che abbiamo prima chiamato « effetto rizosfera » va visto in un quadro più ampio, che abbraccia problemi non solo microbiologici ma anche fitopatologici (FLORENZANO, 1972).

Data la preminente importanza della coltura degli Agrumi in Sicilia e anche in considerazione dell'incidenza delle malattie radicali (che si avviano a diventare sempre più gravi in vista della probabile sostituzione dell'Arancio amaro con altri portinnesti meno resistenti a tali malattie), abbiamo avviato ricerche sulla microflora della rizosfera degli Agrumi, delle quali riportiamo di seguito i primi risultati.

DESCRIZIONE DELLE PROVE E RISULTATI

In questa prima fase dell'indagine è stata analizzata da un punto di vista quantitativo la microflora fungina, attinomicetica e batterica pre-

sente nella rizoplana e rizosfera (1) di piante di Agrumi vegetanti in un campo (2) dell'Istituto di Coltivazioni arboree di questa Facoltà di Agraria, sito a Parco d'Orleans (Palermo). A tale scopo sono state utilizzate otto piante di Limone della cv Femminello, di nove anni di età, inne-

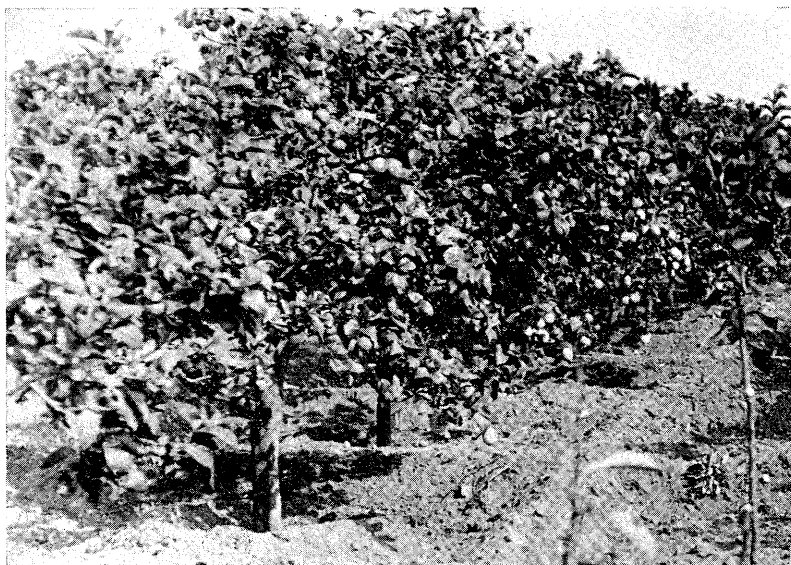


Fig. 1 — Veduta di alcune delle piante dai cui apparati radicali sono stati prelevati i campioni di suolo rizosferico.

state su Arancio amaro e opportunamente scelte nell'ambito del limoneto. Come controllo sono stati prelevati campioni di terreno nello stesso appezzamento non interessato dalle radici delle piante.

L'indagine è stata effettuata in modo tale da valutare la microflora della rizosfera e della rizoplana in rapporto allo stato vegetativo delle radici dormienti e vegetanti. Poiché in Sicilia, secondo i dati della letteratura (DAMIGELLA, 1969), confermati dalle nostre stesse osservazioni,

---

La microflora della rizosfera è stata valutata prelevando i campioni di terreno a pochi cm. dalle radici, mentre per la rizoplana veniva presa in considerazione la zona di terreno aderente alle stesse.

(2) L'analisi chimica e fisico-meccanica del terreno, gentilmente eseguita dall'Istituto di Chimica agraria dell'Università degli Studi di Palermo, ha dato i seguenti risultati: sabbia 39,11%; limo 18,80%; argilla 35,72%; calcare 13,73%; azoto totale 1,71‰;  $P_2O_5$  assimilabile 0,17‰;  $K_2O$  totale 19‰; pH 8,3.

le radici sono in pieno riposo durante il mese di febbraio e in attiva vegetazione durante luglio, le analisi sono state effettuate nella seconda quindicina di febbraio e di luglio, 1971.

Il prelievo dei campioni, in ragione di uno per ciascuna delle otto piante e di due per il terreno di controllo, e le analisi microbiologiche relative, sono stati effettuati seguendo la metodologia suggerita da Po-

Tab. 1. — Dati medi della microflora in corrispondenza di radici dormienti e vegetanti. Confronto fra i dati della rizosfera e della rizoplana.

	Funghi (x 10 <sup>8</sup> )	Attinomiceti (x 10 <sup>6</sup> )	Batteri (x 10 <sup>6</sup> )
RIZOSFERA (Radici dormienti)	359	14,87	206,1
RIZOPLANA (Radici dormienti)	1111,87 **	149,43 **	330,9 *
RIZOSFERA (Radici vegetanti)	625	42,23	309,8
RIZOPLANA (Radici vegetanti)	555,37	90,76 **	560,4 ***

\* dato significativo per P = 0,05

\*\* dato significativo per P = 0,01

\*\*\* dato significativo per P = 0,001

CHON e TARDIEUX (1962); per il conteggio dei batteri è stato adoperato il substrato agarizzato di THORTON (AINSWORTH, 1966).

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica, confrontando fra loro sia i dati della rizoplana e della rizosfera (Tab. I) sia quelli dei due prelievi, effettuati, come detto, in corrispondenza delle radici dormienti e vegetanti (Tab. II).

#### DISCUSSIONE

Dall'esame della Tab. I, dove sono messi a confronto i dati medi relativi al numero di microrganismi della rizosfera e della rizoplana nelle due epoche in cui sono stati eseguiti i prelievi, risulta un diverso comportamento della microflora della rizosfera rispetto a quella della rizo-

plana, con prevalenza di quest'ultima. Un tale giudizio vale per funghi, attinomiceti e batteri del prelievo di febbraio, a radici dormienti, nonché per attinomiceti e batteri del prelievo estivo, a radici vegetanti, mentre il numero dei funghi di quest'ultimo prelievo non si è differenziato statisticamente da quello del periodo precedente, invernale. Analizzando la Tab. II, dove sono posti a confronto i dati della microflora delle radici

Tab. 2. — Dati medi della microflora della rizosfera e della rizoplana. Confronto fra i dati delle radici dormienti e vegetanti.

	Funghi (x 10 <sup>8</sup> )	Attinomiceti (x 10 <sup>6</sup> )	Batteri (x 10 <sup>6</sup> )
RIZOSFERA (Radici dormienti)	359	14,87	206,1
RIZOSFERA (Radici vegetanti)	625 *	42,23 **	309,8
RIZOPLANA (Radici dormienti)	1111,87	149,43	330,9
RIZOPLANA (Radici vegetanti)	555,37 **	90,76	560,4 ***

\* dato significativo per P = 0,05

\*\* dato significativo per P = 0,01

\*\*\* dato significativo per P = 0,001

dormienti e vegetanti, per quanto riguarda la microflora della rizosfera del prelievo di luglio, rispetto a quello di febbraio, si è registrato un significativo aumento della popolazione fungina (P = 0,05) e di quella attinomicetica (P = 0,01), mentre per i batteri, anche se c'è stato un aumento, tale aumento non è risultato statisticamente apprezzabile. Per quanto si riferisce alla rizoplana, invece, nel prelievo del mese di luglio, rispetto a quello di febbraio, si è avuto un aumento della popolazione batterica (P = 0,001) e una diminuzione della popolazione fungina (P = 0,01) e attinomicetica, anche se in quest'ultimo caso non c'è stata una significatività statistica. Infine, analizzando la Tab. III, dove è riportato l'effetto rizosfera, appare evidente la costanza con cui tale fenomeno si manifesta, raggiungendo talora valori elevati, specialmente in corrispondenza dei prelievi con radici vegetanti.

Come era nelle aspettative i diversi gruppi di microrganismi sono stati influenzati in maniera evidente, ma diversa, dalle radici delle piante e dal loro stato vegetativo. In particolare, una costante influenza hanno esercitato le radici in entrambi i periodi considerati, maggiormente in vicinanza delle radici, dal momento che, come appare dalla Tab. II, una più numerosa popolazione microbica è stata osservata nella rizoplana rispetto alla rizosfera. Ciò si spiegherebbe con la presenza, in prossimità delle radici, di prodotti del loro disfacimento, con la liberazione di composti organici, con una maggiore concentrazione di anidride carbonica e ioni nutritivi e, infine, col parziale essiccamento del suolo dovuto all'assor-

Tab. 3. — Dati relativi all'effetto-rizosfera rilevato nelle condizioni delle nostre prove.

EPOCA DI PRELIEVO	Funghi (x 10 <sup>8</sup> )			Attinomiceti (x 10 <sup>6</sup> )			Batteri (x 10 <sup>6</sup> )		
	R	S	R/S	R	S	R/S	R	S	R/S
Febbraio 1971 (radici dormienti)	359	231	1,55	14,87	5	2,97	206,1	38	5,42
Luglio 1971 (radici vegetanti)	625	288	2,17	42,23	2	21	309,8	4	77,25

R. = rizosfera; S = terreno di controllo.

bimento di acqua da parte delle radici. A questi fattori può darsi che se ne associno altri ancor oggi sconosciuti; comunque gli elementi fondamentali del determinismo dell'effetto-rizosfera restano sempre il disfacimento radicale e la liberazione di composti organici vegetali (PICCI, 1970).

In febbraio, come detto, i funghi sono risultati più numerosi nella rizoplana che nella rizosfera, mentre in estate non è stata riscontrata alcuna differenza significativa. Tale comportamento può essere attribuito alle favorevoli condizioni saprofitarie che si realizzano nella rizoplana in inverno, poiché il materiale che deriva dal disfacimento delle radici in riposo può sostenere i funghi meglio di quanto non possano fare gli essudati radicali delle radici vegetanti (PARKINSON e coll., 1963). C'è da considerare, inoltre, il fatto che il minor numero di batteri presenti nella rizoplana in febbraio, può essere un'altra ragione per la maggiore incidenza dei funghi. Considerando ancora i funghi osserviamo che gli stessi nella rizoplana sono risultati più numerosi in febbraio che in luglio; al contrario, nella rizosfera sono risultati più numerosi in luglio che in feb-

braio. La maggiore presenza della flora fungina della rizoplana in febbraio, rispetto a luglio, può essere attribuita, analogamente al fenomeno considerato in precedenza, alle favorevoli condizioni saprofitarie che si hanno in febbraio, durante il riposo delle radici, e alla minore incidenza della popolazione batterica; per quanto si riferisce alla maggiore presenza dei funghi della rizosfera in estate, si può pensare, invece, ad una semplice influenza favorevole della più alta temperatura.

Gli attinomiceti, sia nelle radici dormienti, sia nelle radici vegetanti, sono risultati più numerosi nella rizoplana che nella rizosfera. Ancora, gli attinomiceti nello stadio delle radici vegetanti (luglio), rispetto a quello delle radici dormienti (febbraio), sono diminuiti nella rizoplana, anche se non significativamente, e aumentati nella rizosfera, con ogni probabilità, per un benefico effetto della più alta temperatura estiva. Tale effetto della temperatura sembra che sia stato neutralizzato, nell'ambito della rizoplana, dalla sfavorevole influenza di altri fattori.

In febbraio ed in luglio i batteri sono risultati, come gli attinomiceti, più numerosi nella rizoplana che nella rizosfera. Inoltre, nei prelievi di luglio rispetto a quelli di febbraio, è stato messo in evidenza un aumento della popolazione batterica sia della rizoplana che nella rizosfera, anche se in quest'ultimo caso la differenza non è stata significativa. Il notevolissimo aumento della popolazione batterica della rizoplana può trovare giustificazione, oltre che in una più favorevole temperatura di sviluppo, nella maggiore attività essudativa delle radici e, forse anche, in una minore incidenza dei funghi. Per quanto riguarda, invece, il modesto aumento, peraltro non significativo, dei batteri della rizosfera, non si può fare lo stesso discorso per una maggiore distanza dalle radici, e resta, quindi, da considerare soltanto il probabile effetto favorevole della temperatura.

A questo punto, a conclusione di quanto fin qui detto a proposito degli essudati radicali e dei prodotti del disfacimento delle radici, c'è tuttavia da precisare che non si sa bene fino a qual punto queste sostanze intervengono nell'esaltare o deprimere lo sviluppo dei diversi gruppi e specie microbiche, nonostante gli approfonditi studi di PARKINSON e PEARSON (1965).

I risultati delle nostre ricerche concordano come andamento generale con quelli ottenuti in India su varietà di Arancio dolce, Mandarino e Pomelo, da RANGASWAMI e VASATHARAJAN (1962), tenendo conto delle diverse condizioni sperimentali, pedoclimatiche e colturali, cui vanno probabilmente imputate le specifiche differenze riscontrate. In Italia le uniche ricerche sull'argomento sono state quelle condotte in Campania, su



Aranci, da FORMISANO (1955), anche esse svolte in condizioni sperimentali ben lontane dalle nostre.

Le indagini su cui si è riferito costituiscono, come detto, l'avvio delle ricerche relative ai problemi della rizosfera delle piante di Agrumi in Sicilia.

La sperimentazione in corso tende ad estendere tali ricerche ad impianti agrumicoli in condizioni pedoclimatiche, colturali e fitopatologiche differenti, approfondendole con indagini qualitative.

#### RIASSUNTO

È stata analizzata quantitativamente la microflora fungina, attinomicetica e batterica della rizopiana e della rizosfera di piante di Limone della cv Femminello, di nove anni di età e innestate su Arancio amaro.

I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica confrontando fra loro sia i dati della rizosfera e della rizopiana sia quelli dei due prelievi effettuati, in corrispondenza delle radici dormienti (febbraio) e vegetanti (luglio).

La microflora è risultata variamente influenzata in relazione alla distanza delle radici e al loro stato vegetativo.

#### SUMMARY

Quantitative studies were made on the microflora (fungi, actinomycetes and bacteria) of the rhizosphere and rhizoplane of nine year old «Femminello» lemon trees on Sour Orange rootstock. The trials were carried out in Citrus orchard near Palermo, during 1971.

The results, statistically confronted, showed a different influence of the roots, with regard to their vegetative state and to the distance of the samples.

#### BIBLIOGRAFIA

- AINSWORTH G.C. e G.R. BISBY — *Dictionary of the fungi*. 5<sup>a</sup> Ed. Commonwealth. Mycological Institute. Kew, Surrey (1966).
- BOULARD B. e R. MOREAU — *Sol, microflore et végétation*. Masson et C edituers. Paris, pp. 172 (1962).
- DAMIGELLA P. — *Influenza delle tecniche colturali sull'accrescimento delle radici di arancio amaro/clementine*. Tec. Agric. Catania, 21, 329-347 (1969).
- FLORENZANO G. — *Elementi di Microbiologia del terreno*. Ed. REDA (1972).
- FORMISANO M. — *Ricerche microbiologiche sulla «rizosfera» delle piante coltivate nei terreni della Campania*. Ann. Fac. Sci. Univ. Napoli, 21, 251-345 (1955).
- HILTNER L. — *Ueber neuere Erfahrungen und Problemen auf dem Gebiet Bodembakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache*. Arb. dtsh. Landw. Ger. 98, 59-78 (1904).

- PARKINSON D., TAYLOR G.S. e R. PEARSON — *Studies on fungi in the root region. I. The development on fungi on young roots.* Plant and Soil, XIX, 3, 332-349 (1963).
- PARKINSON D. e R. PEARSON — *Factors affecting the stimulation of fungal development in the root region.* Nature, 9, 205-206 (1965).
- PICCI G. — *La popolazione microbica del terreno agrario.* Agricoltura, Roma 6, 25-30 (1970).
- POCHON J. e P. TARDIEUX — *Techniques d'analyse en microbiologie du sol.* Ed. de la Tourelle, St. Mandè (Seine), pp. 108 (1962).
- RANGASWAMI G. e V.N. VASANTHARAJAN — *I. Quantitative incidence of micro-organisms in relation to root and shoot growth.* Can. J. Microbiol., 8, 479-485 (1962).

LABORATORIO PER LA CHIMICA DEL TERRENO DEL C.N.R. - PISA

P. SEQUI - G. PETRUZZELLI - G. GUIDI - M. LA MARCA

INDAGINI PRELIMINARI SULLE PROPRIETÀ  
DELLE SECREZIONI RADICALI IN SOLUZIONE IDROPONICA

Tra le principali funzioni attribuite alle secrezioni radicali, appaiono ormai accertate quella di modificare la microflora della rizosfera nel senso favorevole alla pianta (6) e quella di facilitare l'assorbimento di elementi nutritivi da parte delle radici principalmente per mezzo di reazioni di chelazione (1).

La composizione chimica delle secrezioni radicali è stata ampiamente indagata su piante di specie diverse ed in differenti condizioni di sviluppo (4, 5, 10). Poco è noto tuttavia sull'effettivo meccanismo di scambio degli elementi nutritivi dal terreno alle radici, ed ancor meno si conosce sul contributo della microflora della rizosfera all'eventuale modificazione delle secrezioni radicali.

Gli elementi nutritivi nel terreno sono assorbiti su superfici di scambio sia organiche che minerali, ed è facilmente ipotizzabile che un agente chelante secreto dalla radice possa agevolmente asportare gli ioni metallici dalla fase solida rendendoli disponibili nella soluzione circolante. D'altra parte, come è noto, la sostanza organica del terreno trattiene gli ioni metallici anche per mezzo di meccanismi di chelazione (7), ed è lecito presupporre l'esistenza di fenomeni di competizione con le secrezioni radicali.

In questa comunicazione riferiamo i risultati di alcune indagini preliminari sulle proprietà chelanti delle secrezioni radicali in relazione a quelle di alcune frazioni della sostanza organica del terreno.

\* \* \*

La determinazione della costante di stabilità apparente dei complessi organo-metallici è stata eseguita utilizzando il metodo di COURPRON (2), che prescinde dalla conoscenza del peso molecolare della sostanza che-

lante. La formula che permette di giungere alla costante di chelazione è la seguente:

$$\log K = \log \left( \frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 \right) - x \log R$$

dove i termini del secondo membro dell'equazione vengono calcolati in base al metodo di SCHUBERT (8), che sfrutta le proprietà di scambio ionico di resine cationiche, ed in base a quello spettrofotometrico delle variazioni continue di JOB (3). Le costanti sono state determinate nei confronti del rame a pH 3,0.

Le frazioni di sostanza organica prese in esame provengono da un frazionamento su poliamide degli acidi fulvici classici già da noi ripor-

*Tabella 1.* — Composizione delle frazioni I e II degli acidi fulvici classici estratti da un terreno di tipo torboso (mg da 100 g di terreno) (9).

	C	N	C/N	P
Frazione I	518	75	6,9	26,5
Frazione II	690	43	16,0	1,3

tato (9). Le due frazioni ottenute dal procedimento presentano un certo interesse per la diversa composizione nel contenuto in fosforo e per il diverso rapporto C/N. Esperienze in corso sembrano indicare nella prima una prevalenza di carboidrati e di sostanze di natura proteica, mentre nella seconda appaiono prevalenti composti di natura aromatica.

Le secrezioni radicali sono state preparate utilizzando piantine di frumento var. S. Pastore fam. 14, allevate per quattordici giorni dalla germinazione in coltura idroponica secondo il metodo di ROVIRA (5) che sfruttando un preventivo essiccamento delle radici provoca una più elevata produzione di essudati.

Le costanti di chelazione ottenute per le due frazioni degli acidi fulvici classici e per le secrezioni radicali sono riportate nella tab. 2. Come

*Tabella 2.* — Costanti di chelazione per il rame a pH 3,0

	log K
Frazione I	3,51
Frazione II	1,93
Secrezioni radicali	5,56

si può notare le due frazioni degli acidi fulvici formano chelati di stabilità notevolmente diversa, essendo la prima di un ordine di grandezza cento volte maggiore della seconda.

Le secrezioni radicali mostrano una stabilità di chelazione di un ordine di grandezza superiore di 100 volte alla frazione I e di 5000 volte superiore alla frazione II. Devono essere tenuti in particolare considerazione alcuni punti di discussione:

1) il valore della costante di chelazione riferito alle secrezioni radicali esprime un dato medio per la miscela di sostanze che le compongono; è lecito aspettarsi che diverse sostanze presenti abbiano una capacità di chelazione molto più elevata e specifica;

2) il valore medio riportato per le secrezioni radicali mostra una reale possibilità di competizione con le frazioni organiche. I metalli possono essere strappati con maggiore facilità alla frazione II, e cioè quella di carattere aromatico e più simile alla maggior parte dei costituenti organici del terreno;

3) la frazione I, che manifesta il più elevato potere chelante è presumibilmente quella di maggior interesse nel metabolismo del terreno, per i fenomeni di degradazione e di resintesi microbica cui è facilmente ipotizzabile sia soggetta.

Le indagini proseguono per studiare l'effetto rizosfera sulle proprietà chelanti delle secrezioni radicali; è allo studio un metodo di isolamento degli essudati radicali direttamente dalle soluzioni idroponiche.

I primi studi da noi condotti in questo senso ci hanno suggerito due tipi di metodi distinti:

a) l'assorbimento da parte di un mezzo opportuno, come per esempio il carbone, delle sostanze organiche contenute nella soluzione idroponica all'atto della sostituzione periodica della stessa;

b) il riciclo della soluzione nutritiva sul mezzo assorbente. Questo secondo metodo, tuttavia, asportando continuamente gli essudati radicali, sembra modificare profondamente la composizione della microflora della rizosfera.

#### RIASSUNTO

Sono state indagate le proprietà chelanti delle secrezioni radicali in relazione a quelle di alcune frazioni della sostanza organica. Il confronto mostra come le secrezioni radicali siano in grado di asportare agevolmente lo ione metallico dalle frazioni organiche del terreno.

SUMMARY

The apparent stability constants of complexes between root secretions and copper have been determined. From a comparison with the figures obtained for some soil organic matter fractions, it appears that root secretions are able to remove the metal ion quite easily from the organic fractions of the soil.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) S. CHABEREK e A.E. MARTELL — *Organic Sequestering Agents*. (Wiley, New York, 1959).
- 2) C. COURPRON — *Determination des constantes de stabilité des complexes organo-métalliques des sols*. Ann. Agron., 18, 623-638 (1967).
- 3) P. JOB — Ann. Chim., 9, 119 (1928).
- 4) A.D. ROVIRA — *Plant-root exudates in relation to the rhizosphere microflora*. Soils Fert., 25, 167-172 (1962).
- 5) A.D. ROVIRA — *Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect*. I. Plant Soil, 7, 178-208 (1962).
- 6) A.D. ROVIRA e B.M. Mc DOUGALL, in: *Soil Biochemistry* (ed. A.D. McLaren e G.M. Peterson), p. 458 (Dekker, New York, 1967).
- 7) M. SCHNITZER e S.I.M. SKINNER — *Organometallic interactions in soils*. I. Soil Sci., 96, 181-186 (1963).
- 8) J. SCHUBERT — *Use of ion exchanges for the determination of physical chemical properties of substances, particularly radiotracers*. J. Phys. Coll. Chem., 52, 340-350 (1948).
- 9) P. SEQUI, G. GUIDI e G. PETRUZZELLI — *Frazionamento e caratteristiche di solubilità degli acidi fulvici*. Agrochimica, 16, 224-233 (1972).
- 10) V. VANCURA — *Root exudates of plants*. III. Plant Soil, 27, 319-328 (1967).

ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA  
DELLA UNIVERSITÀ DI NAPOLI

S. COPPOLA - G. PERCUOCO - A. ZOINA - G. PICCI

CITOCHININE IN GERMI TERRICOLI  
E RELATIVO SIGNIFICATO  
NEI RAPPORTI PIANTE-MICRORGANISMI

Col termine *citochinine* è indicata, come è ormai noto, una classe di sostanze chimicamente ben definite, capaci di promuovere, in sinergia con le auxine, la divisione cellulare, la crescita e l'organogenesi dei tessuti vegetali coltivati *in vitro*. Si tratta di derivati N<sup>6</sup>-sostituiti dall'adenina (tav. 1), rinvenuti come basi o nucleosidi minori, liberi o costituenti alcune specie di acidi ribonucleici di transfer, in diversi sistemi biologici (SKOOG e ARMSTRONG, 1970). In fisiologia vegetale diverse evidenze sperimentali sono state accumulate a dimostrazione dell'effetto *in vivo* di tali sostanze su molteplici fenomeni: induzione, promozione e regolazione della biosintesi del DNA, dell'RNA, delle proteine e della tiamina (POZSÀR et al., 1967, 1968); regolazione dell'organogenesi (MILLER e THIMANN, 1958; SACHS e THIMANN, 1964); stimolazione della fioritura nonché della germinazione dei semi (MILLER, 1956); regolazione della mobilitazione dei metaboliti (MILLER, 1961); preservazione di fiori, frutti, parti vegetative e foglie mediante prevenzione o ritardo della senescenza (RICHMOND e LANG, 1957).

Basi o nucleosidi rari o minori, ipermodificati, con attività citochinica, sono stati isolati anche da diversi microrganismi (tav. 2) eucarioti e procarioti, ma il significato di questi composti nella fisiologia della cellula microbica è, al pari degli altri nucleosidi minori, ancora oscuro.

Il nostro interesse è pertanto rivolto non soltanto ad accertare la diffusione delle citochinine nei microrganismi, ma anche a definire il ruolo di queste sostanze nella vita microbica.

Qui riferiamo i risultati ottenuti ricercando citochinine in due microrganismi terricoli: *Azotobacter chroococcum* e *Bacillus cereus mycoides*.

TAVOLA 1. — Le più note citochinine.

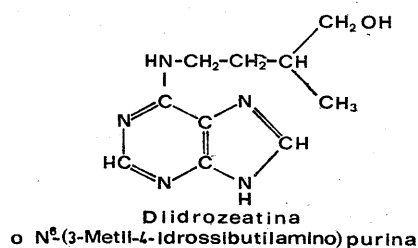
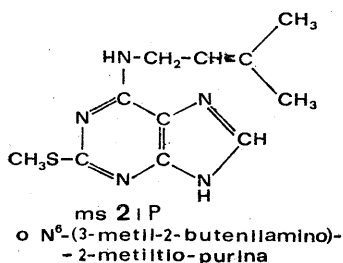
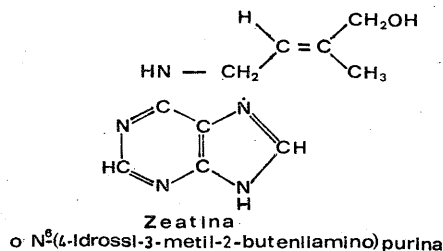
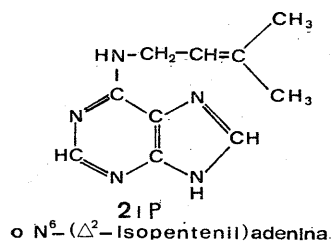
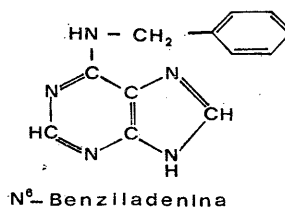
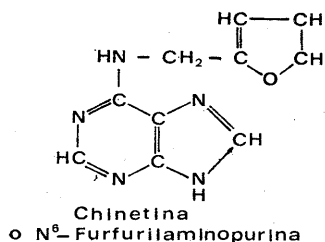


TAVOLA 2. — Specie microbiche da cui sono state isolate sostanze con attività citochinica.

Micorganismi	Autori
<i>Corynebacterium fascians</i>	KLÄMBT et al., 1966
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BIEMANN et al., 1966
<i>Staphylococcus aureus</i>	SKOOG et al., 1966
<i>Bacillus cereus</i>	SKOOG et al., 1966
<i>Azotobacter vinelandii</i>	SKOOG et al., 1966
<i>Micrococcus roseus</i>	SKOOG et al., 1966
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	KLÄMBT, 1967
<i>Rhizopogon roseolus</i>	MILLER, 1967
<i>Streptomyces flaveolus</i>	COPPOLA e GIANNATTASIO, 1968 a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SKOOG e LEONARD, 1968
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	COPPOLA e GIANNATTASIO, 1968 b
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PETERKOFISKY, 1968
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FITTLER et al., 1969
<i>Escherichia coli</i>	BURROWS et al., 1969
<i>Torulopsis utilis</i>	HASHIMOTO et al., 1969
<i>Arthrobacter sp.</i>	BLONDEAU, 1970



## MATERIALI E METODI

Le colture impiegate sono state, per *Az. chroococcum* il ceppo n° 28 della collezione IMAUN, per *Bac. cereus mycoides* il ceppo n° 9634 della ATCC.

Sono state realizzate colture massive liquide a 28-30°C con insufflazione di aria sterile. *Azotobacter* è stato coltivato nel mezzo di Greene (1935); il *mycoides*, invece, in brodo comune di carne sec. Loeffler.

In corrispondenza della fase logaritmica di crescita si procedeva alla raccolta delle cellule per centrifugazione in MSE High Speed 18 con rotore ad azione continua, a 18.000 giri/min. a 4°C. Le cellule venivano quindi lavate con soluzione fisiologica e ricentrifugate. Da 30 l di coltura di ciascun microrganismo, sono stati ottenuti rispettivamente 120 g circa di cellule in pasta umida di *Azotobacter* e 50 g circa di *mycoides*.

Dalle masse microbiche, le citochinine sono state estratte con la tecnica indicata da Letham e da noi opportunamente modificata nel corso di una indagine precedente (COPPOLA et al., 1971). L'intera procedura, schematizzata nella tav. n. 3, porta all'ottenimento di tre distinte frazioni indicate come I, II e III), rispettivamente arricchite in basi nucleiche (frazione butanolica), nucleosidi (frazione in acetato di etile) e nucleotidi (residuo acquoso). Le prime due frazioni sono state portate a secco sotto vuoto in evaporatore rotante a 37°C; la terza è stata liofilizzata. I residui secchi sono stati singolarmente ripresi con poca acqua per le successive indagini: dosaggio dell'attività citochininica e analisi cromatografica dei costituenti.

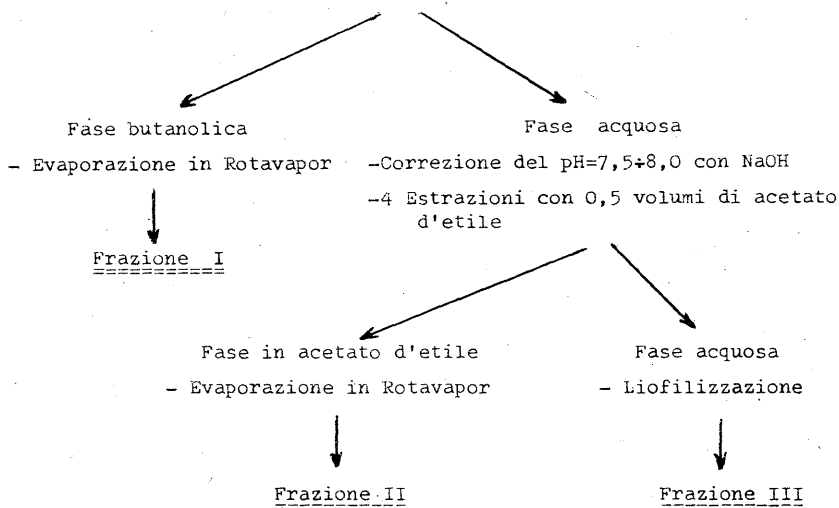
L'attività citochininica delle frazioni ottenute dagli estratti cellulari è stata saggiata col test « senescenza », come indicato da GUNNING e BARKLEY (1963), impiegando segmenti di foglie di avena immersi nelle soluzioni da saggiare variamente diluite ed inoltre, per confronto, in soluzioni a diverse concentrazioni ( $10^{-4} \div 10^{-10}$  M) di una citochinina sintetica (la N<sup>6</sup>-benziladenina, prodotto « purissimo » della Fluka A G) e di una, invece, notoriamente diffusa in natura (la N<sup>6</sup>-Δ<sup>2</sup> isopenteniladenina, impiegata come reagente puro della Sigma Chemicals Co.). Dopo 6 giorni di incubazione al buio, in camera umida a 25°C, si è proceduto alla estrazione, dai segmenti, della clorofilla residua, mediante etanolo al 95% in bagnomaria bollente per 5 min. Si è quindi letta allo spettrofotometro la D.O. dei diversi estratti etanolici a 620 nm. Il saggio, da ampie e ripetute verifiche, è apparso valido e conveniente per la sua rapidità.

Controlli effettuati con adenina e con fitormoni diversi dalle cito-

chine (acido  $\beta$ -indolacetico, gibberellina A<sub>3</sub>) hanno evidenziato una assoluta specificità. Sono state inoltre eseguite due curve standard (una con benziladenina ed una con isopenteniladenina), per poter avere risultati in « equivalenti » riferibili sia ad una citochinina sintetica che ad una naturale.

TAVOLA 3. — Estrazione delle citochinine libere dalle cellule microbiche.

- 2 Estrazioni con etanolo 80% a 40°C per 7 h sotto agitazione (500 ml/100 g di cellule).
- Altre estrazioni con etanolo 70% c.s. fino ad assenza di sostanze UV-assorbente nell'estratto.
- Riunione degli estratti idroalcolici ed evaporazione in Rotavapor a 37°C.
- Solubilizzazione del residuo con acqua + HCl a pH = 3,0.
- 4 Estrazioni con volumi eguali di etere etilico (eliminazione della fase etera).
- Correzione del pH della fase acquosa a 6,5, con NaOH.
- 5 Estrazioni con volumi eguali di n-butanolo saturo d'acqua.



Sulle frazioni degli estratti microbici che hanno mostrato attività citochinica, è stata applicata una tecnica cromatografica nel tentativo di isolare ed identificare le citochinine presenti. Questa tecnica prevede una prima separazione cromatografica preparativa del materiale su lastre per TLC di cellulosa (sono stati impiegati « sheets » di CEL 300 della Macherey, Nagel and Co. con indicatore fluorescente a 254 nm).

Impiegando come solvente sviluppatore 2-butanolo saturo d'acqua, si ottiene una netta separazione delle basi e dei nucleosidi minori, cioè

modificati o ipermodificati, da quelli normali. In questo sistema infatti i costituenti normali degli acidi nucleici « corrono » con un  $R_f$  non superiore a 0,81 ( $R_f$  della timina), mentre quelli modificati sono molto più veloci, localizzandosi pressoché in corrispondenza del fronte del solvente. La banda cromatografica compresa fra il valore  $R_f$   $0.82 \div 0.83$  ed il fronte del solvente, contenente quindi soltanto basi e nucleosidi modificati, è stata asportata dal cromatogramma, eluita con etanolo a 95% e l'eluito concentrato e ricromatografato secondo la tecnica di PLAYTIS e LEONARD (1971) su « sheets » di gel di silice con indicatore fluorescente a 254 nm, impiegando come solvente una miscela, preparata di recente, di cloroformio e metanolo (9:1, v/v). In questo secondo sistema i costituenti nucleici minori vengono ben separati fra di loro (gli Autori che lo hanno proposto, hanno ottenuto la separazione degli isomeri *cis* e *trans* della zeatina). Inoltre essi possono essere esattamente circoscritti alla luce UV (si tratta di sostanze fortemente UV-assorbenti), in modo da eluirli singolarmente ed analizzarli allo spettrofotometro, determinando il loro spettro di assorbimento nell'UV a pH = 1,7 e 12 per l'identificazione.

#### RISULTATI

Nella tavola N° 4 sono riportati i risultati del test « senescenza ». Le diverse frazioni ottenute dagli estratti cellulari (frazione butanolica, in acetato di etile ed acquosa), sono state opportunamente diluite per l'impiego nel dosaggio biologico della loro attività citochinica. La diluizione è stata effettuata in modo tale che, impiegando 5 ml di ciascuna frazione per ogni prova, si potessero riferire i risultati a determinati quantitativi di cellule (peso umido) di partenza. Poiché inoltre 5 ml di soluzione delle citochinine impiegate per la curva standard contengono circa 100  $\gamma$  nella concentrazione  $10^{-4}M$ , 10  $\gamma$  nella concentrazione  $10^{-5}M$ , 1  $\gamma$  nella  $10^{-6}M$  e così via di seguito, è possibile stabilire, con accettabile approssimazione, quanto segue:

1) da 1 g di cellule umide di *Azotobacter chroococcum* sono stati ottenuti circa 0,02  $\gamma$  di « equivalenti-isopenteniladenina » o 0,2  $\gamma$  di « equivalenti-benziladenina » nella frazione butanolica (ricca in basi nucleiche) e, rispettivamente, 0,008  $\gamma$  o 0,08  $\gamma$ , nella frazione in acetato di etile (ricca in nucleosidi);

2) da 1 g di cellule umide di *Bac. cereus mycoides* sono stati invece estratti circa 0,005  $\gamma$  di « equivalenti-isopenteniladenina » o 0,03  $\gamma$

TAVOLA 4. — Risultati del test « senescenza ».

Campioni	D.O. <sub>620</sub> degli estratti clorofillici	Campioni	D.O. <sub>620</sub> degli estratti clorofillici
Controlli (H <sub>2</sub> O)	0.135	Controlli (*)	0.130
6-BA 10 <sup>-4</sup> M	0.480	2iP 10 <sup>-4</sup> M	0.840
» 10 <sup>-5</sup> M	0.470	» 10 <sup>-5</sup> M	0.820
» 10 <sup>-6</sup> M	0.430	» 10 <sup>-6</sup> M	0.730
» 10 <sup>-7</sup> M	0.320	» 10 <sup>-7</sup> M	0.560
» 10 <sup>-8</sup> M	0.190	» 10 <sup>-8</sup> M	0.330
» 10 <sup>-9</sup> M	0.150	» 10 <sup>-9</sup> M	0.170
» 10 <sup>-10</sup> M	0.135	» 10 <sup>-10</sup> M	0.135
<i>Azotobacter chroococcum</i>		<i>Bac. cereus mycoides</i>	
Fraz. I da 0.1 g di cell. umide	0.180	Fraz. I da 0.1 g di cell. umide	0.140
» » 1 g »	0.350	» » 1 g »	0.240
» » 10 g »	0.580	» » 10 g »	0.400
Fraz. II da 0.1 g di cell. umide	0.160	Fraz. II da 0.1 g di cell. umide	0.140
» » 1 g »	0.300	» » 1 g »	0.190
» » 10 g »	0.500	» » 10 g »	0.330
Fraz. III da 1 g di cell. umide	0.130	Fraz. III da 1 g di cell. umide	0.135
» » 10 g »	0.130	» » 10 g »	0.135

(\*) È riportato il valore medio ( $\pm 0.05$ ) ottenuto dai controlli effettuati con varie concentrazioni di adenina e di fitormoni diversi dalle citochinine.

di « equivalenti-benziladenina » nella frazione butanolica; inoltre 0,002  $\gamma$  o 0,01  $\gamma$  nella frazione in acetato d'etile;

3) le frazioni III (fasi acquose), ricche in nucleotidi, per entrambi i microrganismi studiati, non hanno mostrato attività citochinica.

Dall'analisi cromatografica e spettrofotometrica, applicata alle sole frazioni che hanno mostrato attività citochinica, è risultato quanto riportato nella tavola N° 5.

Dei costituenti minori evidenziati nei microrganismi studiati, le sostanze riferite in tabella coi numeri 1 e 10 sono identificabili, dalle loro caratteristiche spettrofotometriche, come 1-metiladenina; le sostanze 4 e 12 come N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenina; le 5 e 13, come N<sup>6</sup>-N<sup>6</sup>-dimetiladenina; la sostanza N° 11, come 1-metilguanina; le sostanze 8 e 16, come N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenosina; le n. 9 e n. 17, come N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenile)-2-

TAVOLA 5. — *Basi e nucleosidi minori evidenziati in Az. chroococcum e Bac. cereus mycoides.*

N.	R <sub>1</sub> nel sistema di Playtys e Leonard	λλ <sub>max</sub> (nm)			λ <sub>min</sub> (nm)
		pH=1,5	pH=7	pH=12	
<i>Az. chroococcum:</i>					
fraz butanolica					
1	0.11	258	265	270	
2	0.23	—	—	—	
3	0.30	—	—	—	
4	0.74	271	269	275	
5	0.82	275	273	280	
6	0.85	248	245		260
		273	273		
<i>Az. chroococcum:</i>					
fraz. in acetato d'etile					
7	0.22	239	239		222
		272	272		260
8	0.56	267	271	271	
9	0.60	238	240	240	260
		275	278	280	
<i>Bac. cereus mycoides:</i>					
fraz butanolica					
10	0.11	258	266	270	
11	0.15	252	249	280	
12	0.73	271	269	275	
13	0.82	275	274	281	
14	0.86	248	245		260
		274	274		
<i>Bac. cereus mycoides:</i>					
fraz. in acetato d'etile					
15	0.23	239	239		222
		271	272		260
16	0.54	267	271	271	
17	0.61	239	239	240	225
		274	276	282	258

metiltioadenosina. Le sostanze 2 e 3, evidenti sui cromatogrammi alla luce UV, sono risultate presenti in tracce troppo esigue per poter ottenere spettri di assorbimento decifrabili. Le sostanze indicate invece coi numeri 6, 7, 14 e 15, presenti in buone quantità negli estratti, hanno mostrato caratteristiche spettrofotometriche che non consentono la loro identificazione con nessuno dei composti (basi o nucleosidi) modificati a tutt'oggi noti e riportati sistematicamente da HALL (1971) nel suo recentissimo trattato. Fra le sostanze identificate tuttavia, diverse, come la N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenina ed il suo riboside, la N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil)-2-metiltioadenosina ed anche la N<sup>6</sup>-N<sup>6</sup>-dimetiladenina, possono pienamente giustificare l'attività citochinica degli estratti.

#### DISCUSSIONE

La presenza di basi e nucleosidi modificati nei microrganismi è un oggetto di ricerca molto interessante in microbiologia: il ruolo ed il significato di questi composti nella biochimica cellulare costituiscono in-

TAVOLA 6. — *Caratteristiche del sistema radicale in plantule di colza coltivate in colture idroponiche in differenti condizioni sperimentali* (da BLONDEAU, C. R. Acad. Sc. Paris, t 270, p. 3158, 1970).

Condizioni sperimentali	Lunghezza delle radici (cm)	Diametro delle radici a 1/3 inferiori della lunghezza (mm)	Diametro del manico di peli assorbenti intorno alle radici alla stessa altezza (mm)
Controllo=sol. di Knopp	7.5	0.6	1.4
+ inoculo batterico			
1 ml	1.6	1.1	4.2
0.1 ml	1.8	1.1	4.0
+ filtrato colturale			
0.5 ml	2.6	1.0	3.8
1.0 ml	1.4	1.1	4.0
+ filtrato colturale ritenuto su Dowex 50			
0.5 ml	5.8	0.8	3.2
1 ml	2.3	1.1	3.8

fatti uno degli aspetti più attuali ed affascinanti della biologia molecolare. Nel caso poi delle basi e dei nucleosidi ipermodificati con attività citochinica, la loro presenza nei microrganismi, e non soltanto in quelli capaci di stabilire con le piante associazioni simbiotiche a livello istologico, rende un'idea molto più marcata del grado di intimità cui possono giungere, in natura, i rapporti piante-microrganismi. Le evidenze sperimentali raccolte dal dottor BLONDEAU (1970), ricercando l'effetto di filtrati colturali di *Arthrobacter* e di loro estratti con attività citochinica sulle caratteristiche del sistema radicale di plantule di colza, possono costituire un esempio tipico al riguardo. I dati riferiti nella tav. n° 6, riportata dal lavoro dell'Autore citato, mostrano come il microrganismo e le citochinine da lui prodotte provochino un accorciamento delle radici ma un notevole aumento dei manicotti di peli assorbenti che queste portano e che sono destinati ad esaltarne le fondamentali funzioni. Una concezione pertanto del fenomeno rizosferico, soltanto come « effetto » di un insieme di modificazioni chimiche, fisiche e biologiche indotte dalla pianta allo ambiente edafico interessato al sistema radicale, deve ritenersi imprecisa. La rizosfera, col suo pullulare di microrganismi non soltanto indirettamente (mineralizzazione della sostanza organica), ma anche direttamente attivi sulla pianta (elaborazione di fitormoni), appare piuttosto come una condizione, la più opportuna condizione di vita della pianta.

#### RIASSUNTO

Estratti contenenti basi nucleiche e nucleosidi da *Azotobacter chroococcum* e da *Bacillus cereus mycoides* hanno mostrato attività citochinica. Basi e nucleotidi modificati sono stati isolati e purificati per cromatografia su strato sottile. La spettrofotometria-UV ha consentito l'identificazione di diversi composti, fra i quali quattro noti per la loro attività citochinica.

Il ruolo di questi metaboliti microbici è considerato nelle interrelazioni piante-microrganismi del suolo.

#### SUMMARY

Extracts from *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus cereus mycoides* containing nucleic bases and nucleosides have shown cytokinin activity. Modified bases and nucleosides have been isolated and purified by T.L.C. Several compounds, four of which are known for their cytokinin activity, were identified by U.V.-spectrophotometry.

In this paper the role of these microbial metabolites in soil microorganisms-higher plants relationships is considered.

BIBLIOGRAFIA

- BIEMANN K., TSUNAKAWA S., SONNENBICHLER J., FELDMANN H., DÜTTING D. e ZACHAU H. G. (1966) — *Struktur eines ungewöhnlichen Nucleosids aus serin-spezifischer tRNA*. Angew. Chem., 78, 600.
- BLONDEAU R. (1970) — *Production d'une substance de type cytokinine par des Artrobacter d'origine rhizosphérique*. C. R. Acad. Sc. Paris, 270, 3158.
- BURROWS W.J., ARMSTRONG D.J., SKOOG F., HECHT S.M., BOYLE J.T.A., LEONARD N.J. e OCCOLOWITZ J. (1969) — *The isolation and identification of two cytokinins from Escherichia coli tRNA*. Biochemistry, 8, 3071.
- COPPOLA S. e GIANNATTASIO M. (1968 a) — *Attività citochinica in un actinomicete rizosferico*. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., XLIV, 22, 1913.
- COPPOLA S. e GIANNATTASIO M. (1968 b) — *Attività citochinica in frazioni dell'acido ribonucleico isolato dal Rhizobium leguminosarum Frank*. Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Napoli, IV, 3.
- COPPOLA S., TUCCI G. e PICCI G. (1971) — *Growth-rates and cytokinin contents in Saccharomyces cerevisiae Hansen*. Giornale di Microbiol., in corso di stampa.
- FITTLER F., KLINE L.K. e HALL R.H. (1968) in Hall (1971), p. 320.
- GREENE R.A. (1935) — *Studies on protein synthesis by Genus Azotobacter*. Soil Sci., 39, 327.
- GUNNING B.E.S. e BARKLEY W.K. (1963) — *Kinin-induced directed transport and senescence in detached oat leaves*. Nature, 199, 262.
- HALL R.H. (1971) — *The Modified nucleosides in nucleic acids*. Columbia Univ. Press, New York.
- HASHIMOTO S., MIYAZKI M. e TAKEMURA S. (1969) — *Nucleotide sequence of tyrosine transfer RNA from Torulopsis utilis*. J. Biochem., 65, 659.
- KLÄMBT D. (1967) — *Nachweis eines cytokinins aus Agrobacterium tumefaciens und sein vergleich mit dem cytokinin aus Corynebacterium fascians*. Wissenschaftliche Zeitschr. der Univ. Rostock, 4/5, 623.
- KLÄMBT D., THIES e SKOOG F. (1966) — *Isolation of cytokinins from Corynebacterium fascians*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 56, 52.
- MILLER C.O. (1956) — *Similarity of some kinetin and red light effects*. Plant Physiol., 31, 318.
- MILLER C.O. (1961) — *Kinetin and related compounds in plant growth*. Ann. Rev. Plant Physiol., 12, 395.
- MILLER C.O. (1967) — *Zeatin and Zeatin riboside from a mycorrhizal fungus*. Science, 157, 1055.
- MILLER C.O. and SKOOG F. (1963) — *Chemical control of bud formation in tobacco stem segments*. Am. J. Bot., 40, 768.
- PETERKOFKY A. (1968) — *The incorporation of mevalonic acid into the N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosine of tRNA in Lactobacillus acidophilus*. Biochemistry, 6, 472.
- PLAYTIS A.J. e LEONARD N.J. (1971) — *The Synthesis of ribosil-cis-zeatin and thin layer chromatographic separation of the cis and trans isomers of ribosilzeatin*. Bioch. Bioph. Res. Commu., 45, 1.
- POZSAR B.I., HAMMADY M. EL. e KIRALY Z. (1967) — *Cytokinin effect of Benzyladenine: increase of nucleic acid and protein synthesis in bean leaves*. Nature, 214, 273.



- POZSAR B.I. e MATOLESY G.Y. (1968) — *Regulatory effect of N<sup>6</sup>-Benzyladenine and Pseudobymine (6-Methyluracil) on the synthesis of nucleic acids.* Nature, 217, 848.
- RICHMOND A. e LANG A. (1957) — *Effect of Kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves.* Science, 125, 650.
- SACHS T. e THIMANN K.V. (1964) — *Release of lateral buds from apical dominance.* Nature, 201, 939.
- SKOOG F. e ARMSTRONG D.J. (1970) — *Cytokinins.* Ann. Rev. Plant. Physiol., 23, 339.
- SKOOG F., ARMSTRONG D.J., CHERAYIL J.D., HAMPEL A.E. e BOCK R.M. (1966) — *Cytokinin activity: localization in tRNA preparations.* Science, 154, 1354.
- SKOOG F. e LEONARD N.J. in Letham D.S. (1968) — *Biochemistry and physiology of plant growth substances.* Whitman F., Setterfield G. Eds. Runge, Ottawa, -942.
- WICKSON M. e THIMANN K.V. (1958) — *The antagonism of auxin and kinetin on apical dominance.* Physiol. Plant., 11, 62.

CENTRO DI STUDIO DEI MICRORGANISMI AUTOTROFI DEL C.N.R.  
PRESSO L'ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELL'UNIVERSITÀ DI FIRENZE

*Direttore:* Prof. GINO FLORENZANO

C. PAOLETTI - F. FAVILLI - R. MATERASSI - G. FLORENZANO

VALUTAZIONE DELL'AZOTOFISSAZIONE RIZOSFERICA  
CON IL TEST DELLA RIDUZIONE DELL'ACETILENE

Le nostre conoscenze sulla azotofissazione libera nel suolo sono basate in gran parte su metodi indiretti di valutazione scarsamente correlati con la reale attività azotofissatrice dei terreni, anche perché è ormai noto che la capacità a fissare azoto atmosferico è posseduta da un cospicuo numero di specie microbiche aventi disparate esigenze fisiologiche.

Pertanto un metodo di misura diretta dell'attività azotofissatrice dei microrganismi e degli habitat naturali consentirebbe di verificare la reale portata di diverse nozioni ancora oggi prive di un valido sostegno sperimentale.

Diversi anni orsono alcuni ricercatori hanno misurato l'azotofissazione libera del suolo impiegando la tecnica dell'azoto marcato (DELWICHE e WIJLER, 1956); ma le difficoltà di applicazione di questo metodo lo rendono non alla portata di tutti i laboratori.

Le osservazioni di DILWORTH (1966) sull'attività riducente della nitrogenasi sull'acetilene hanno aperto nuove ed interessanti prospettive per misurare l'attività azotofissatrice nei diversi habitat naturali e per controllare la capacità ad utilizzare l'azoto atmosferico da parte dei microrganismi (STEWART et al., 1967, 1970; HARDY e coll., 1968; HILL e POSTGATE, 1969; YASHIDA e ANCAJAS, 1969; BROUSES e KNOWLES, 1971).

La determinazione della attività azotofissatrice viene eseguita dosando l'etilene formato dalla riduzione dell'acetilene ad opera dell'enzima nitrogenasi. Questa determinazione è basata sull'esistenza di una relazione quantitativa costante tra la reazione di riduzione dell'azoto molecolare

$(N_2 + 6H^+ + 6e \rightarrow 2NH_3)$  e la reazione di riduzione dell'acetilene ( $C_2H_2 + 2H^+ + 2e \rightarrow C_2H_4$ ).

Poiché la riduzione di una molecola di azoto esige 6 elettroni e la riduzione di una molecola di acetilene ne esige solamente 2, il rapporto molecolare teorico  $C_2H_4$  formato/  $N_2$  ridotto è di 3 : 1.

Nel nostro Centro il test della riduzione dell'acetilene è impiegato da due-tre anni per lo studio dei problemi connessi con l'azotofissazione (con particolare riguardo alla inibizione esercitata dallo azoto combinato), l'attività azotofissatrice nel terreno, nella rizosfera e nella fillosfera.

In questa nota si riferiscono alcuni dati dedotti dalla misura dell'azotofissazione nella rizosfera di alcune piante erbacee. Questi dati sono ottenuti nell'ambito di una indagine microbiologica sulla evoluzione dello stato microbiologico di suoli degradati sottoposti a colture erbacee ed a inoculazione con batteri ed alghe.

#### METODI E MATERIALI

*Campioni esaminati.* — I campioni di suolo rizosferico sono stati prelevati da 4 parcelle sperimentali allestite su una pendice argillosa soggetta a forte erosione, situata a Vicarello (Pisa) nella Azienda dell'Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo di Firenze.

La destinazione delle 4 parcelle è stata la seguente:

- 1 — test non coltivato;
- 2 — graminacee (miscela 1 : 1 di *Festuca roudinacea* e *Dactylis glomerata*);
- 3 — graminacee con medica;
- 4 — medica.

Le parcelle hanno ricevuto i seguenti trattamenti fertilizzanti alla semina: qli. 10/ha di superfosfato, qli. 1,4/ha di solfato ammonico e kg. 0,250/ha di sodio molibdato.

La semina è stata fatta ai primi giorni del mese di aprile 1971 ed i semi di medica sono stati inoculati con un ceppo efficace di *Rhizobium meliloti*.

All'inizio dell'esperimento furono rilevate alcune caratteristiche chimiche del terreno (pH 8,3; azoto totale 0,187%; carbonio totale 0,910%; rapporto C/N 4,8) e microbiologiche, da cui si rilevò l'assenza quasi totale di *Azotobacter*.

A metà del mese di maggio ed alla fine del mese di giugno, in cor-

rispondenza dell'inizio e del massimo sviluppo delle piantine furono fatti dei prelievi nelle parcelle. Il terreno rizosferico è stato ottenuto dallo scuotimento degli apparati radicali delle piantine estirpate dopo avere eliminato i grumi più grossi.

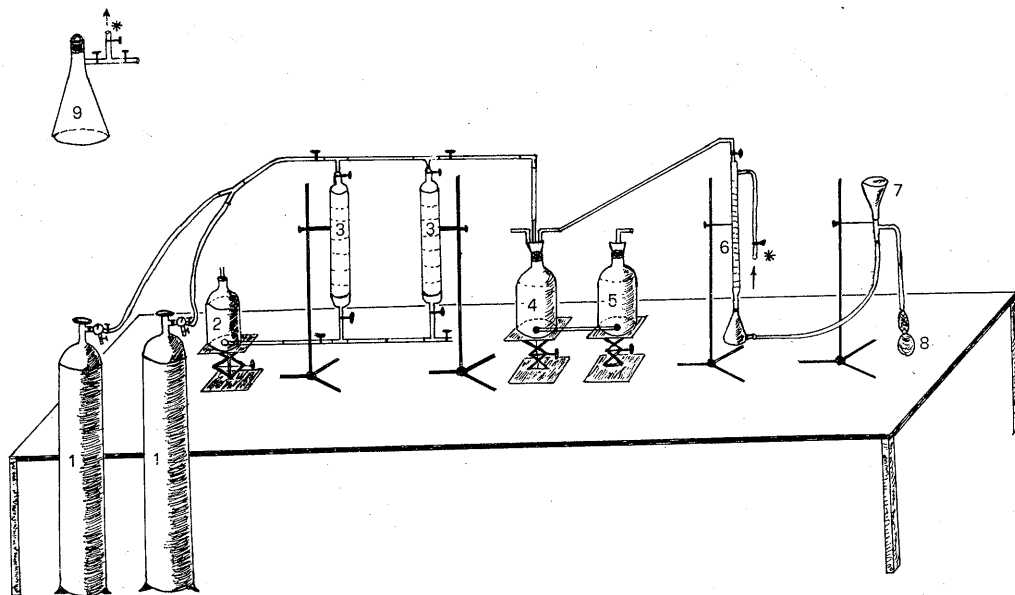
*Dosaggio dell'etilene.* — La determinazione dell'etilene è stata effettuata con un gas cromatografo Carlo Erba Fractovac CI 452 ad ionizzazione di fiamma. È stata usata una colonna in acciaio inossidabile della lunghezza di 150 cm. e del diametro interno di 2 mm. riempita di Porapak R; la temperatura della colonna è stata fissata a 48° C, mentre l'evaporatore è stato tenuto a temperatura ambiente. La portata del gas vettore (azoto) è stata regolata al valore di 25 ml/minuto e quelle dell'idrogeno e dell'aria a 17,4 e 176 ml/minuto. In queste condizioni, i tempi di ritenzione dell'etilene e dell'acetilene sono rispettivamente 1,20 e 1,62 minuti. Con etilene a grado di purezza del 99,90% sono state effettuate, nelle stesse condizioni sperimentali sopra citate, due curve di taratura, l'una da 5 a 30 nMole di C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> e l'altra da 30 a 300 nMole.

*Esecuzione del saggio.* — Nelle prove preliminari l'attività riducente da parte del terreno rizosferico tal quale è stata estremamente esigua per cui era problematico porre in evidenza eventuali differenze. Si è fatto quindi ricorso ad una preincubazione con terreno addizionato di mannite in modo da esaltare l'attività della microflora azotofissatrice presente. Pertanto 10 g di terreno sono stati introdotti in una beutina di 73 ml di capacità ed inumiditi con acqua distillata fino al raggiungimento del 50% della capacità idrica massima.

I tempi di preincubazione sono stati di 15, 40 e 64 ore, trascorse le quali nelle beutine, chiuse con tappo a vite con fondo di caucciù, è stato fatto il vuoto ed immessa una miscela gassosa di argon e ossigeno in rapporto 4 : 1 (0,95 atmosfere) a cui viene aggiunto il 5% di acetilene (pari a 0,05 atmosfere) (Fig. 1).

Abbiamo usato la miscela argon-ossigeno perché ha dato, in prove preliminari, migliori risultati rispetto al solo argon.

Per svelare la eventuale produzione di etilene da parte del suolo, come test sono stati preparati dei campioni di terra con la sola miscela argon-ossigeno. Ogni prova è stata fatta in triplo. I dosaggi dell'etilene sono stati fatti dopo 6-12-24 ore di contatto con l'acetilene per poter bene rilevare la velocità di riduzione, iniettando nel gascromatografo, con una microsiringa, 200  $\mu$ l di miscela gassosa (Fig. 2).



Legenda

- |                                    |                                 |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1 = Bombole di ossigeno e di argon | 2 = Vaso di livello             |
| 3 = Miscelatori                    | 4 = Contenitore miscela gassosa |
| 5 = Vaso di livello                | 6 = Buretta di misura           |
| 7 = Beuta di livello               | 8 = Pompetta premente           |
| 9 = Beutina con terreno            | * = Attacco per la beutina      |

Fig. 1 — Dispositivo per la preparazione della miscela gassosa  $A_r + O_2$  (4 : 1).

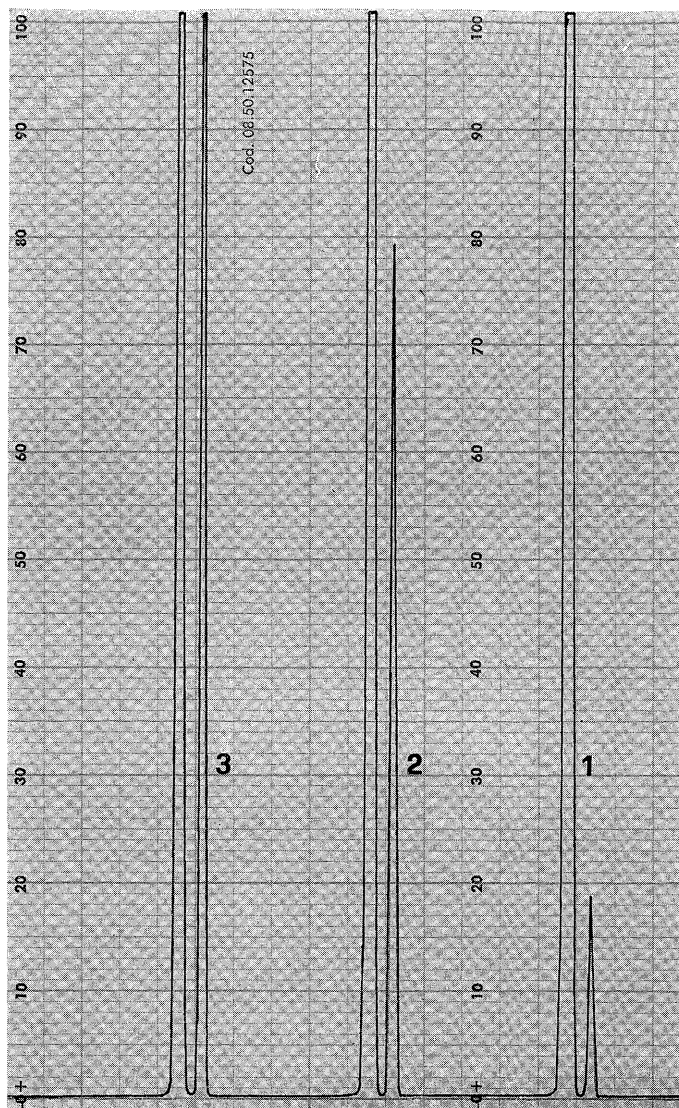


Fig. 2 - Gas cromatogrammi della miscela gassosa acetilene-etilene di un campione di terreno di rizosfera di graminacee incubato in atmosfera di Argon ed Ossigeno dopo 6 ore (1), 24 ore (2) e 48 ore (3).

RISULTATI

In via preliminare occorre precisare che, operando nel modo sopra descritto, ciò che si determina è l'attività azotofissatrice potenziale della rizosfera e non quella attuale.

Questo modo di operare è stato reso opportuno dalla esigua attività riducente riscontrata nel terreno rizosferico tal quale.

Si deve ricordare che altri AA, fra i quali HAUKE-PACEWICZOVA e coll. (1969-70), YASHIDA e ANCAJAS (1970), RINAUDO e coll. (1971),

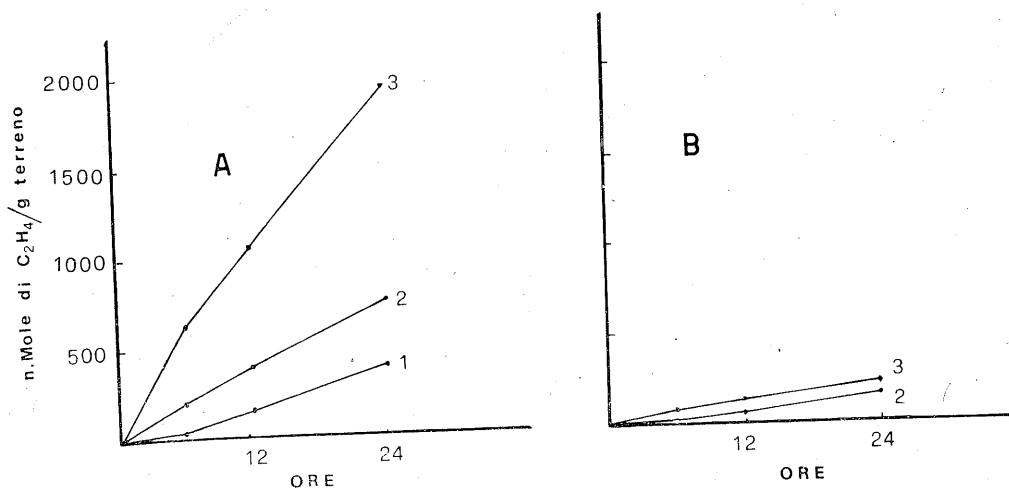


Fig. 3 - Produzione di etilene nella rizosfera di graminacee (A) e di medica + graminacee (B) dopo 15 (1), 40 (2) e 64 ore (3) di preincubazione.

WEINHARD et al. (1971) hanno potuto misurare l'attività azotofissatrice nel suolo rizosferico tal quale. Va considerato che questi AA. hanno operato in condizioni che non rispecchiano lo stato naturale del terreno, sia perché hanno tenuto i suoli in sommersione, sia perché hanno operato con una rizosfera artificiale, nella quale si realizzano condizioni che poco hanno a che vedere con la rizosfera di pieno campo.

La tecnica da noi adottata per confrontare l'attività azotofissatrice dei diversi campioni rizosferici, non presenta gli inconvenienti sopra citati e tuttavia consente di ottenere dati facilmente confrontabili, poiché si deve ammettere l'esistenza di una relazione abbastanza stretta tra l'attività azotofissatrice attuale ed il modo con cui si evolve l'attività riducente nei campioni preincubati (Fig. 3).

A tale proposito nella figura 3 sono poste a confronto le curve di riduzione dell'acetilene di differenti rizosfere, dopo 15-40-64 ore di preincubazione con mannite. È evidente che la rizosfera di graminacee (A) deve avere una popolazione azotofissatrice più numerosa ed attiva di quella della rizosfera mista medica-graminacee (B).

Nelle tabelle I e II sono esposti i dati di riduzione dell'acetilene da parte della rizosfera di graminacee con medica e di medica da sola. Nella prima serie di prelievi, effettuati dopo 40 giorni dalla semina, si intravedono già delle differenze di attività azotofissatrice fra le varie rizosfere, perché l'attività riducente della rizosfera di medica è sensibilmente infe-

Tab. I - Riduzione dell'acetilene nella rizosfera di medica, di graminacee (*Dactylis glomerata* e *Festuca rondinacea*) e di medica con graminacee.

Rizosfera di	Prelievo n.	nMole di C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g di terreno secco		
		tempo di preincubazione ore (1)		
		15	40	64
Medica	I	—	0,40	0,80
	II	—	0,20	0,75
	III	—	0,55	0,80
Graminacee	I	2,85	15,40	3,05
	II	3,20	14,35	3,30
	III	2,90	14,95	3,35
Medica con Graminacee	I	—	1,60	2,45
	II	—	1,50	2,40
	III	—	1,55	2,55

(1) Terreno addizionato dell'1% di mannite, portato al 50% della capacità idrica massima ed incubato a 28°C.

riore a quella delle altre. Queste differenze divengono nettamente più evidenti nella seconda serie di prelievi effettuati alla fine del mese di giugno (Tab. II).

I dati ottenuti nelle condizioni sperimentali sopra precisate, mostrano che nella rizosfera di medica esiste un'attività azotofissatrice più bassa rispetto a quella riscontrata sia nella rizosfera di graminacee sia di medica con graminacee.

A questo proposito dobbiamo dire che la buona attività azotofissatrice riscontrata nella rizosfera di graminacee è un fatto abbastanza nor-



male come hanno riscontrato molti AA. tra cui RIVIÈRE (1957) sul grano; WEINHARD (1971) sul riso e paspalo.

Per contro sull'attività azotofissatrice nella rizosfera delle leguminose i dati sono discordanti e spesso contraddittori. Gli effetti stimolanti od inibitori riscontrati a carico dell'azotofissazione dipendono spesso, oltre che dal tipo di pianta, anche dalla stagione, dalla natura e tipo del terreno e dallo stato delle colture. Un effetto rizosfera negativo a carico dell'azotofissazione libera nelle leguminose, è stato riscontrato da vari AA. JENSEN (1942) trovò che nella rizosfera di medica e di trifoglio bianco non si aveva alcuna azione su *Azotobacter*; GEBGARDT (1952) riscontrò nella

Tab. II - Riduzione dell'acetilene nella rizosfera di medica, di graminacee (*Dactylis glomerata* e *Festuca roudinacea*) e di medica con graminacee.

Rizosfera di	Prelievo n.	nMole di C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/g di terreno secco		
		tempo di preincubazione ore (1)		
		15	40	64
Medica	I	—	1,35	2,25
	II	—	1,60	2,50
	III	—	1,55	2,45
Graminacee	I	17,20	80,40	29,90
	II	16,55	82,20	32,00
	III	16,55	75,00	31,70
Medica con Graminacee	I	—	5,85	8,50
	II	—	6,50	9,05
	III	—	6,55	8,85

(1) Terreno addizionato dell'1% di mannite, portato al 50% della capacità idrica massima ed incubato a 28°C.

rizosfera di medica coltivata in un cernosem una inibizione dell'azotofissazione libera; TANATIN (1953) osservò che nella rizosfera di medica al primo anno di coltivazione veniva inibita l'attività degli *Azotobacter*, ma al secondo anno tale inibizione cessava.

Anche nella rizosfera del pisello è stata riscontrata da KATZNELSON (1961) e da BALLONI e MATERASSI (1966) una inibizione dell'*Azotobacter*.

Nel nostro caso l'inibizione riscontrata nelle parcelle ove vi è la medica da sola o con le graminacee si spiega col fatto che la medica fortemente batterizzata alla semina ha dato luogo a piante con numerosi no-

duli efficaci e si sa che le piante leguminose ben nodulate essudano notevoli quantità di composti azotati, fatto questo che rappresenta un fattore sfavorevole per l'attività dei batteri azotofissatori liberi nella rizosfera.

Oltre alle ricerche sulla azotofissazione nella rizosfera, sui risultati delle quali è stato qui in parte riferito, la tecnica della riduzione dell'acetilene è da noi attualmente impiegata in ricerche sulla azotofissazione in altri habitat naturali, quali la fillosfera, su simbiosi azotofissatrici e sugli aspetti fisiologici ed ecologici della attività azotofissatrice autotrofica ed eterotrofica.

In tutte queste ricerche questa sensibile e versatile tecnica di valutazione della azotofissazione si è dimostrata capace di dare informazioni estremamente interessanti e non ottenibili con altri metodi.

#### RIASSUNTO

Impiegando la tecnica della riduzione dell'acetilene è stata studiata l'attività azotofissatrice della rizosfera di medica e di graminacee (*Dactylis glomerata* e *Festuca roudinacea*). È stato osservato che il suolo prelevato dalla rizosfera di graminacee riduce l'acetilene più attivamente di quello prelevato nella rizosfera di medica.

#### SUMMARY

Nitrogen fixation in rhizosphere soil of alfalfa (*Medicago sativa*) and of gramineous plants (*Dactylis glomerata* and *Festuca roudinacea*) has been investigated with the acetylene reduction test. It has been shown that soil from gramineous plants rhizosphere reduces acetylene more actively than rhizosphere soil from alfalfa.

#### BIBLIOGRAFIA

- BALLONI W. e R. MATERASSI - *Recherches sur l'influence des engrais chimiques sur la microflore du sol. II. Influence sur l'effet rhizosphere.* Ann. Inst. Pasteur, 111, 39 (1966).
- BROUZES R. e R. KNOWLES - *Inhibition of growth of Clostridium pasteurianum by acetylene, implication for nitrogen fixation assay.* Canad. J. Microbiol., 17, 1483 (1956).
- DELWICHE C. e J. WIJLER - *Non symbiotic fixation in soil.* Plant and Soil, 7, 113 (1956).
- DILWORTH M.J. - *Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from Clostridium pasteurianum.* Biochem. Biophys. Acta, 127, 286 (1966).
- DOMMERMUES Y., V. JACQ e G. BECK - *Influence de l'engorgement sur la sulfato-réduction rhizosphérique dans un sol salin.* C.R. Acad. Sc. Paris, 268, s. D., 605 (1969).

- GEBGARDT A.G. - *Inhibition of Azotobacter growth in wheat Rhizosphere*. Naukovi Zap, L'vivs'K Derzh Universitetu im Franka, vol. 20 (1952).
- JENSEN H.L. - *Nitrogen fixation in leguminous plants. II. Is symbiotic nitrogen fixation influenced by Azoobacter?* Proc. Linnean Soc. N.S. Wales, 67, 205 (1942).
- HARDY R.W.F., R.D. HOLSTEIN, E. K. JACKSON e R.C. BURNS - *The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: Laboratory and field evaluation*. Plant Physiol., 43, 1185 (1968).
- HILL S. e E.J. POSTGATE - *Failure of putative Nitrogen-Fixing bacteria to fix nitrogen*. J. Gen. Microb., 58, 277 (1969).
- HAUKE PACEWICZOVA T., J. BALANDREAU e Y. DOMMERGUES - *Influence de l'engorgement sur la fixation microbienne de l'azote moleculaire dans la rhizosphere d'un mais*. C.R. Acad. Sci. Paris, 269, s.D., 1356 (1969).
- HAUKE PACEWICZOVA T., J. BALANDREAU e Y. DOMMERGUES - *Fixation microbienne de l'azote dans un sol salin tunisien*. Soil Biol. Biochem., 2, 47 (1970).
- KATZNELSON H. e E. STRZELCZYK - *Studies on the interaction of plants and free-living nitrogen-fixing microorganisms. I. Occurrence of Azotobacter in the rhizosphere of crops plants*. Canad. J. Microbiol., 7, 437 (1961).
- RICE W.A. e E.A. PAUL - *The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil*. Canad. J. Microbiol., 17, 1049 (1971).
- RINAUDO G. e Y. DOMMERGUES - *Validité de l'estimation de la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphere par la methode de réduction de l'acetylene*. Ann. Inst. Pasteur, 121, 93 (1971).
- RIVIÈRE J. - *Etude microbiologique de la rhizosphere du blé. I. Groupes fonctionnels microbiens et stade de croissance*. Ann. Inst. Pasteur, 92, 272 (1957).
- RUINEN J. - *The phyllosphere. III. Nitrogen fixation in the phyllosphere*. Plant and Soil, 22, 375 (1965).
- RUINEN J. - *The phyllosphere. IV. Cuticle decomposition by microorganisms in the phyllosphere*. Ann. Inst. Pasteur, 111, 342 (1966).
- STARKEY R.L. - *Interrelation between microorganisms and plant roots in the rhizosphere*. Bact. Rev., 22, 154 (1958).
- STEWART W.D.P., C.P. FITZGERALD e R.H. BURRIS - *In situ studies on N<sub>2</sub>-fixation using the acetylene reduction technique*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 58, 2071 (1967).
- STEWART W.D.P. - *Algal fixation of atmospheric nitrogen*. Plant and Soil, 32, 555 (1970).
- TANATIN B. Ya. - *Distribution of Azotobacter in soil and the rhizosphere of Agricultural Plants in the Ielinabad region*. Tadzhikistan Thesis, Leningrad, 1953.
- WEINHARD P., J. BALANDREAU, G. RINAUDO e Y. DOMMERGUES - *Fixation non symbiotique de l'azote dans la rhizosphere de quelques non leguminoses tropicales*. Rev. Ecol. Biol. Sol, VIII, (3), 367 (1971).
- YOSHIDA T. e R. ANCAJAS ROSE - *Application of the acetylene reduction method in nitrogen fixation studies*. Soil Sci. and Plant Nutrition, 16, 324 (1970).

ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELL'UNIVERSITÀ DI PISA  
CENTRO DI STUDIO PER LA MICROBIOLOGIA DEL SUOLO  
DEL C.N.R.

A. A. LEPIDI - M. P. NUTI - M. DE BERTOLDI

METABOLISMO DEL POLI- $\beta$ -IDROSSIBUTIRRATO NEL TERRENO  
E NELLA RIZOSFERA (\*)

Spesso la presenza di un acido organico nel suolo viene dedotta, più che da una determinazione diretta, dalla considerazione che nel suolo sono dimostrati presenti i microrganismi che, in condizioni fisiologiche, ne sono produttori. Così, per esempio, l'acido 2-chetogluconico (WEBLEY e DUFF, 1965) o l'acido lattico (PRESCOTT e DUNN, 1959). Alcuni acidi organici, e principalmente l'acido formico e acetico, sono invece stati isolati e determinati quantitativamente (SCHWARTZ e Coll., 1954); la presenza di questi acidi è da taluni ritenuta un fatto patologico per il suolo (OSUGI e AOKI, 1957), mentre secondo altri essi si liberano durante l'idrolisi di sostanze molto più complesse (JORGENSEN, 1961). In ogni caso le quantità di acidi organici fugacemente liberi nel suolo sono il risultato di un equilibrio cinetico tra il rilascio dell'acido da parte del microorganismo (per ragioni fisiologiche o meno) e la sua utilizzazione da parte della microflora o delle piante e la fissazione sui colloidi e sui chelanti del terreno.

Tra i molti acidi organici prodotti dai microorganismi e che finiscono nel suolo, non è stato finora riconosciuto un ruolo degno di nota all'acido  $\beta$ -idrossibutirrico ed ai suoi prodotti di polimerizzazione. Che però questo acido raggiunga il terreno e che lo raggiunga in quantità considerevoli si può facilmente comprendere qualora si considerino da una parte la larga presenza nel suolo di microorganismi produttori di poli-

---

(\*) Lavoro del Gruppo di Studio per la Conservazione dell'Integrità Biologica del Suolo del Ministero Agricoltura e Foreste.

TAB. 1. — *Microorganismi produttori di poli-β-idrossibutirrato.*

Microorganismo	Bibliografia
<i>Azotobacter chroococcum</i>	LEMOIGNE, 1943; SCHLEGEL et al., 1961; LUNDGREN et al., 1965; NUTI et al., 1972.
<i>Azotobacter vinelandii</i>	FORSYTH et al., 1958.
<i>Azotobacter agilis</i>	FORSYTH et al., 1958.
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	SENIOR et al., 1971.
	LEMOIGNE, 1923; MACRAE et al., 1958; WILLIAMSON et al., 1958; SLEPECKI et al., 1960, 1961; LUNDGREN et al., 1965; GAVARD et al., 1967; GRIEBEL et al., 1968.
<i>Bacillus mycoides</i>	LEMOIGNE, 1946.
<i>Bacillus cereus</i>	LEMOIGNE, 1946; MACRAE et al., 1958.
<i>Bacillus anthracis</i>	LEMOIGNE, 1946.
<i>Bacillus subtilis</i>	LEMOIGNE, 1946.
<i>Chlorogloea fritschii</i>	JENSEN et al., 1971.
<i>Chromobacterium violaceum</i>	FORSYTH et al., 1958.
<i>Chromobacterium sp.</i>	FORSYTH et al., 1958.
<i>Chromatium okenii</i>	SCHLEGEL et al., 1962; LUNDGREN et al., 1965.
<i>Clostridium perfringens</i>	NUTI et al., 1972.
<i>Clostridium sprenoides</i>	NUTI et al., 1972.
<i>Cytophaga sp.</i>	STEWART et al., 1971.
<i>Ferrobacillus ferrooxidans</i>	LUNDGREN et al., 1965; WANG et al., 1969.
<i>Hydrogenomonas sp.</i>	SCHLEGEL et al., 1961; LUNDGREN et al., 1965.
<i>Lampropedia hyalina</i>	LUNDGREN et al., 1965.
<i>Micrococcus halodenitrificans</i>	SMITHIES et al., 1955; SIERRA et al., 1962; LUNDGREEN et al., 1965.
<i>Micrococcus denitrificans</i>	LUNDGREN et al., 1965.
<i>Nitrospina gracilis</i>	WATSON et al., 1971.
<i>Nitrococcus mobilis</i>	WATSON et al., 1971.
<i>Nitrobacter sp.</i>	TOBBACK et al., 1965.
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	VAN EOOI et al., 1971.
<i>Pseudomonas sp.</i>	FORSYTH et al., 1958; HAYWARD et al., 1959; DELAFIELD et al., 1965.
<i>Pseudomonas antimycetica</i>	FORSYTH et al., 1958.
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	FORSYTH et al., 1958.
<i>Pseudomonas methanica</i>	KALLIO et al., 1960.
<i>Pseudomonas lemoignei</i>	DELAFIELD et al., 1965; LUSTY et al., 1966.
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	LEVINE et al., 1960.
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	DOUDOROFF et al., 1959.
<i>Rhodobacillus sp.</i>	GAFRON et al., 1935.
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	DOUDOROFF et al., 1959; MERRICK et al., 1961, 1965; BOATMAN, 1966.
<i>Rhizobium sp.</i>	FORSYTH et al., 1958; HAYWARD et al., 1959; ALPER et al., 1963; LUNDGREN et al., 1965.
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	NUTI et al., 1972.
<i>Spirillum normaal</i>	LUNDGREN et al., 1965.
<i>Spirillum itersonii</i>	LUNDGREN et al., 1965.
<i>Spirillum serpens</i>	HAYWARD et al., 1959; LUNDGREN et al., 1965.
<i>Sphaerotilus discophorus</i>	STOKES et al., 1968.
<i>Sphaerotilus natans</i>	ROUF et al., 1962.

$\beta$ -idrossibutirrato (PHB) (vedi Tab. 1) e dall'altra il fatto che nel terreno i microorganismi sono soggetti ad un rapido alternarsi di generazioni e di popolazioni (BROCK, 1971) con un vivace turnover citologico. Questi fenomeni, che in epoca recente sono stati studiati con particolare interessamento, includono azioni antagonistiche varie tra microorganismi, come la produzione di fattori lisogeni diffusibili da parte di *Pseudomonas* verso le *Azotobacteriaceae* (POSTGATE, 1967) ed il parassitismo tra forme microbiche diverse, quali ad es. batteri verso batteri (caso del *Bdellovibrio*; STOLP e STARR, 1963), funghi verso batteri etc.

Molto spesso il PHB costituisce parte considerevole della sostanza secca delle cellule. È noto infatti che in *Rhizobium* ed in *Azotobacter* si raggiunge rispettivamente il 58 ed il 70-80% del peso secco cellulare (FORSYTH e Coll., 1958) (STOCKDALE e Coll., 1968). D'altra parte questi microorganismi sono notoriamente molto diffusi nel suolo e vanno a costituire una percentuale rilevante dei 2.500 Kg/ha di cellule batteriche, mediamente trovate nei terreni agrari (DOMMERMUES e MANGENOT, 1970). Si può quindi presumere che le quantità di PHB che raggiungono il suolo si aggirino su diversi grammi per m<sup>2</sup> per anno.

Stando ad alcune nostre recenti ricerche (NUTI e Coll., 1972), le granulazioni di PHB nelle cellule di *Az. chroococcum* sono circondate da membrane. Sembra verosimile che, perché il PHB, sostanza completamente idrofobica, possa subire le trasformazioni enzimatiche che presiedono alla sua sintesi e alla sua demolizione, debbano esistere delle connessioni tra le membrane ed il loro contenuto, oppure che il PHB « nativo » nell'ambito della cellula si trovi in uno stato fisico particolare. E poco chiaro risulta ancora il tipo di rapporti che gli enzimi idrolitici intrattengono col prodotto (GAVARD, comunicazione personale). Resta quindi aperto il problema di stabilire sotto quale forma il PHB raggiunga il suolo: come tale, come lipoproteina e con quale grado di polimerizzazione. Il grado di polimerizzazione del prodotto nativo non è ancora stato accertato con sicurezza. Nostre recenti indagini hanno però dimostrato che i valori di peso molecolare debbono aggirarsi su livelli ben più alti di quelli sospettati fino a qualche tempo fa (NUTI e Coll., 1972). Il p. m. inoltre è influenzato da vari fattori, tra cui la presenza nel mezzo di particolari composti quali l'acido fenilacetico, quest'ultimo presente nel suolo (WEBLEY e Coll., 1956). D'altra parte, sconosciuti ci sono ancora i fenomeni che accompagnano la lisi cellulare ed il rilascio dei vari materiali citoplasmatici, compresi quelli di riserva.

Nell'intento di chiarire il significato della presenza del PHB nel terreno, stiamo conducendo una duplice indagine, intesa a stabilire 1) l'in-

fluenza del composto sulla struttura del suolo e 2) la persistenza e gli aspetti del suo metabolismo nel suolo. Su questo secondo aspetto riferiamo nella presente Nota.

## MATERIALI E METODI

### *Sintesi del poli- $\beta$ -idrossibutirrato- $^{14}C$*

Una coltura di *Azotobacter chroococcum* Beij., ceppo AC 16, già da noi impiegato in altra ricerca (NUTI e Coll., 1972) per la notevole capacità di sintetizzare PHB, veniva inoculata in 100 ml di soluzione Daste (DASTE e Coll., 1968) e mantenuta a 28°C per 12 h sotto agitazione. 10 ml di sospensione venivano trasferiti in beute con 100 ml dello stesso mezzo e agitati per 24 h; si aggiungevano 250 ml di soluzione Daste ed acetato di sodio al 5 per mille (ivi compreso 0,7 mg di acetato di sodio- $^{14}C$ ). Dopo incubazione nelle stesse condizioni per 21 h, le cellule di *Azotobacter* venivano raccolte per centrifugazione a 2500 rpm x 10 min.

L'estrazione e la purificazione del PHB sono state eseguite col metodo da noi precedentemente descritto (NUTI e Coll., 1972). L'identificazione a mezzo di spettrometria all'infrarosso forniva il caratteristico picco di assorbimento a 235 nm (LAW e SLEPECKI, 1961). Il peso molecolare, calcolato per viscosimetria (LUNDGREN e Coll., 1965), era di circa 200.000.

L'attività specifica del prodotto estratto veniva calcolata per scintillazione liquida di un campione di 100  $\lambda$ , prelevato da una soluzione in cloroformio all'1 per mille, ed aggiunta a 10 ml di miscela scintillante (v. oltre).

### *Aggiunta di PHB- $^{14}C$ al terreno*

50 mg di PHB marcato, con attività specifica di 10 mCi/mM venivano solubilizzati in 50 ml di cloroformio; frazioni di 10 ml ciascuna erano fatte assorbire da circa 20 grammi di terreno (il terreno era composto, in parti uguali, da torba, acriperlite, terreno medio impasto); dopo evaporazione del solvente, e comunque non prima di 24 h, il terreno veniva immesso nelle colonne descritte nel paragrafo successivo, già riempite per  $\frac{3}{4}$  dello stesso terreno artificiale.

### *Apparato ecosistema acqua-terreno*

È stato elaborato un sistema chiuso, consistente in un cilindro di plastica alto circa 30 cm, sulla parte superiore del quale è apposto un cilindro di vetro alto 10 cm, onde permettere un'adeguata illuminazione di eventuali piante. Il cilindro è a sua volta collegato, nella parte superiore, ad una trappola per CO<sub>2</sub> (100 ml di NaOH 20%) e, nella parte inferiore, con un recipiente contenente 200 ml di acqua, anch'esso collegato con una trappola per CO<sub>2</sub>.

L'apparecchio è disposto in modo tale da poter operare periodiche saturazioni del terreno, innalzando il recipiente con l'acqua fino al livello del cilindro di vetro. Eccettuata quest'operazione, l'acqua non si trova allo stato di riposo, ma viene continuamente agitata con apposito agitatore elettromagnetico per simulare le condizioni naturali di ossigenazione.

Lo sviluppo di <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> viene eseguito mediante periodici campionamenti delle soluzioni di NaOH e scintillazione in fase liquida a mezzo di opportuno scintillatore.

### *Rilevamento della radioattività*

Tutte le determinazioni di radioattività erano eseguite per scintillazione in fase liquida con scintillometro Packard mod. Tri-carb 2001. Le condizioni di lettura per il <sup>14</sup>C venivano mantenute come segue: gain 66%, finestre da A a B, discriminatori 50-1.000.

Le miscele di scintillazione avevano la seguente composizione: per il PHB (soluzione 1 per mille in cloroformio), toluene 1.000, PPO 4 g, Me<sub>2</sub> POPOP 4,1 g; per la frazione biologica, costituita da cellule digerite con formamide (NEUJÄHR e EWALSSON, 1964) e per la frazione saponificabile, Insta-gel Packard; per la frazione oleosa recuperata con metanolo, toluene « scintillation grade »; per la <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> miscela scintillante di Yardley (YARDLEY, 1964); per le cromatografie su carta, metanolo/toluene 1 : 1 (v/v).

### *Recupero delle frazioni biologiche e delle frazioni organiche non biologiche*

La frazione biologica dell'acqua veniva raccolta per centrifugazione a 3.000 rpm per 10 min. Il materiale microbico così raccolto, naturalmente frammisto a piccole quantità di sostanze umificate scarsamente solubili, veniva utilizzato per gli ulteriori esami autoradiografici.



La frazione non biologica consiste essenzialmente del supernatante della frazione precedente e dell'estratto del terreno contenuto nelle colonne. L'acqua sovranatante veniva suddivisa in aliquote sottoposte a diversi trattamenti, e precisamente:

- A - Aggiunta di etanolo 95% 1/1 (v/v).
- B - Aggiunta di  $\text{HClO}_4$  4%.
- C - Estrazione con etere di petrolio in ambiente acido; dopo l'evaporazione del solvente il recupero della frazione organica era fatto con alcool metilico, ottenendosi così una frazione oleosa.
- D - Estrazione con etere di petrolio in ambiente alcalino; la frazione organica era recuperata come sopra.
- E - Precipitazione con  $\text{FeCl}_3$  in eccesso; dal sedimento la frazione organica era recuperata come sopra.
- F - Precipitazione con idrato di Ba; dal sedimento la frazione organica era recuperata come sopra.
- G - Precipitazione con solfato ammonico 20%.
- H - Precipitazione con solfato ammonico 70%.
- I - Precipitazione con etanolo 95% (v/v) in ambiente basico da KOH. Il sedimento fioccoso, fulvo, veniva sottoposto a idrolisi per la liberazione degli aminoacidi con HCl per 24 h a 50°C.

I risultati scintilligrafici delle frazioni precedentemente descritte hanno indicato la metodologia da seguire per il recupero di eventuali frazioni marcate nel terreno. Quest'ultimo era stato estratto con 700 ml di KOH 10%. Il liquido di estrazione veniva acidificato con HCl 10N, operando con cautela per la conseguente liberazione di  $^{14}\text{CO}_2$ . Si procedeva quindi all'estrazione con etere di petrolio ed al recupero della frazione oleosa.

#### *Autoradiografie della frazione biologica.*

Il materiale microbico raccolto per centrifugazione dal recipiente con l'acqua veniva lavato ripetutamente con tampone fosfato 0,1 M a pH 8,5 allo scopo di allontanare eventuali tracce di radioattività occasionalmente legata sulla parte esterna delle pareti cellulari, e in seguito veniva sottoposto a sedimentazione differenziale a 2.000 rpm per 15 min in gradiente di saccarosio 14-20-40%. In tal modo era possibile separare funghi e alghe dai batteri e questi dai minuscoli frammenti di sostanza organica. Il mantenimento dei vari campioni era fatto mediante aggiunta di formalina 10%. Una goccia della sospensione, precedentemente lavata

con tampone sterile per allontanare la formalina veniva appoggiata su un vetrino portaoggetti albuminato e, dopo aggiunta di una goccia di fissativo Carnoy, la preparazione seguiva i metodi tradizionali. Dopo la apposizione dell'emulsione per autoradiografie (emulsione K 2 della Ilford), i vetrini erano mantenuti a 4°C per 4 giorni, quindi sviluppati con Kodak D19 e fissati con Unifix Kodak; dopo la disidratazione in serie crescente d'alcool, venivano montati con Euparal ed osservati alla microscopia in luce normale e in contrasto di fase.

#### *Autoradiografie della frazione organica.*

*Cromatografie:* la frazione oleosa, consistente in prodotti saponificabili, veniva concentrata sotto vuoto e quindi sottoposta a cromatografia ascendente secondo Isherwood e Hanes (1953) su carta Whataman n. 1 con, ad eluente, n-propanolo/NH<sub>4</sub> (d = 0,880) = 60/40. Il rilevamento degli spots era fatto con bleu timolo.

Su questi stessi cromatogrammi veniva ricercata la distribuzione della radioattività attraverso due procedimenti:

- A - Il cromatogramma, dopo una corsa di 20 cm, veniva ritagliato in piccole strisce di 0,5 cm. Queste venivano estratte con etere di petrolio e, dopo evaporazione nei vials per il conteggio, si procedeva ai rilievi scintilligrafici mediante aggiunta di opportuno scintillatore.
- B - Dopo essiccamento i cromatogrammi venivano sottoposti ad autoradiografia secondo Mayaudon (comunicazione personale): dopo accurata essiccazione, il cromatogramma era posto in contatto con un film per raggi X e mantenuto al riparo della luce per circa 10 giorni. Tale lasso di tempo è sufficiente per rivelare uno spot di 300 counts/min per cm<sup>2</sup>. Lo sviluppo ed il fissaggio erano eseguiti rispettivamente con G150 Gevaert e FXL Ferrania.

#### *Trattamenti al terreno, spermosfera, rizosfera.*

All'inizio della prova, le colonne di terreno, montate su apposito supporto, venivano seminate con circa 10 semi ciascuna, delle seguenti specie vegetali: mais, grano, pisello. Una colonna rimaneva senza semi, come controllo, ed un'altra infine veniva sterilizzata per esposizione a vapori di formaldeide per circa 24 h. Esami microbiologici confermavano in quest'ultimo caso l'avvenuta sterilizzazione; naturalmente, nei giorni successivi, il terreno andava soggetto a graduale ricolonizzazione microbica. Le indagini al livello di spermosfera e rizosfera erano condotte secondo le tradizionali tecniche microbiologiche.

### RISULTATI

La dinamica dello sviluppo di  $^{14}\text{CO}_2$  duante 45 giorni di saggio, è riportata in Fig. 1.

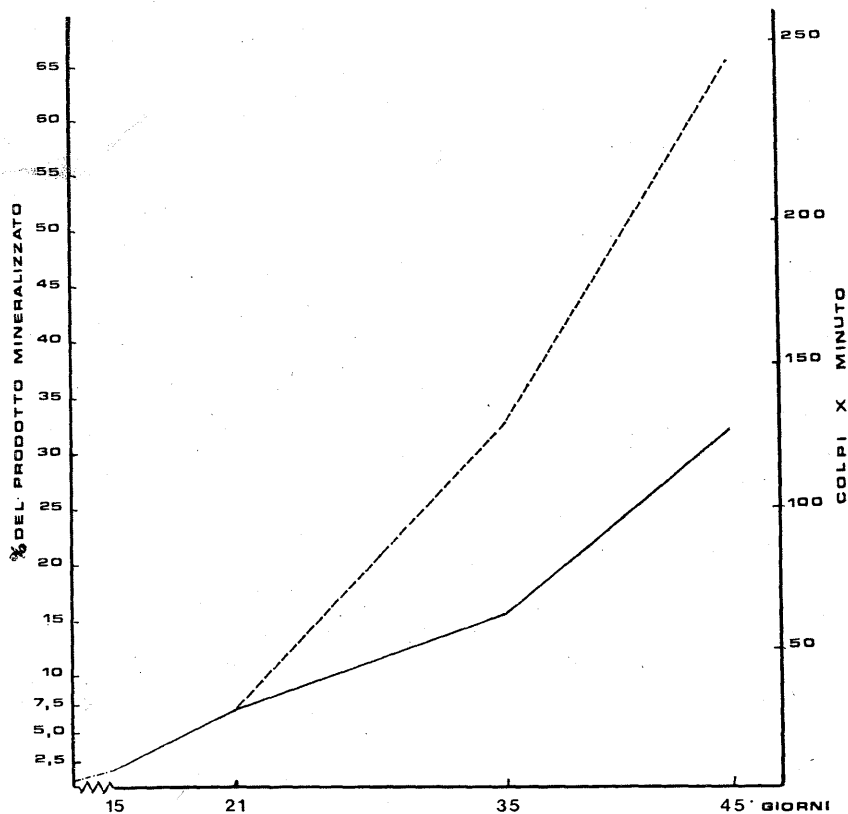


Fig. 1 - Cinetica dello sviluppo di  $^{14}\text{CO}_2$  nei 45 giorni successivi all'aggiunta di poli- $\beta$ -idrossibutirrato- $^{14}\text{C}$  al terreno, in condizioni naturali (linea tratteggiata) e con sterilizzazione del terreno all'inizio della prova (linea continua).

Per quanto concerne gli esami autoradiografici della frazione biologica dell'acqua d'imbibizione e percolamento, è stato rilevato che risultano marcate, sia dopo 7 che dopo 45 giorni dall'inizio della prova, soprattutto le ife fungine (Vedi figg. 2-4). Dopo sette giorni le alghe non risultano essere marcate, mentre a 20, a 35 e a 45 giorni si sono potute

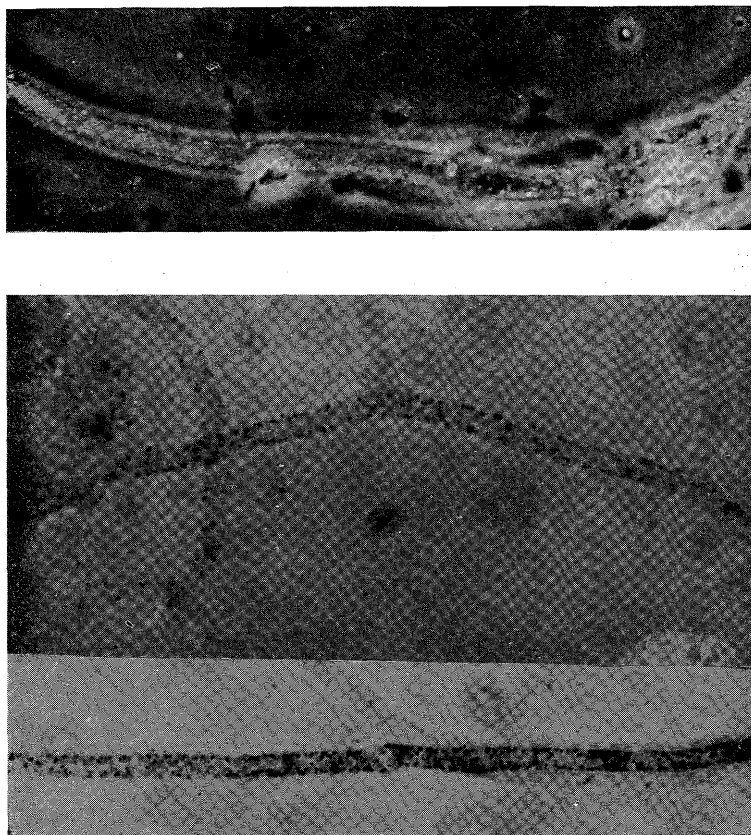


Fig. 2 - Autoradiografie di ife fungine dopo 5 giorni dall'inizio della prova (A) e dopo 7-10 giorni (B).

individuare mediamente circa il 30% di cellule algali con grani di radioattività sviluppati; ciò è in accordo con la dinamica dello sviluppo di  $^{14}\text{CO}_2$  (Vedi fig. 5). In ogni caso, le autoradiografie delle cellule algali non davano mai un'intensità di marcatura paragonabile a quella delle ife fungine. Le cellule batteriche infine non hanno rivelato alcuna radioattività, tranne che in due casi (su circa 100 preparati osservati).

Per quanto riguarda i valori di scintillazione ritrovati nella frazione sostanza organica, buona parte della radioattività si accumula nella frazione estraibile con etere di petrolio in ambiente acido, cioè nella frazione acida organica saponificabile. Notevole il fatto che nella frazione aminoacidica la radioattività era assente.

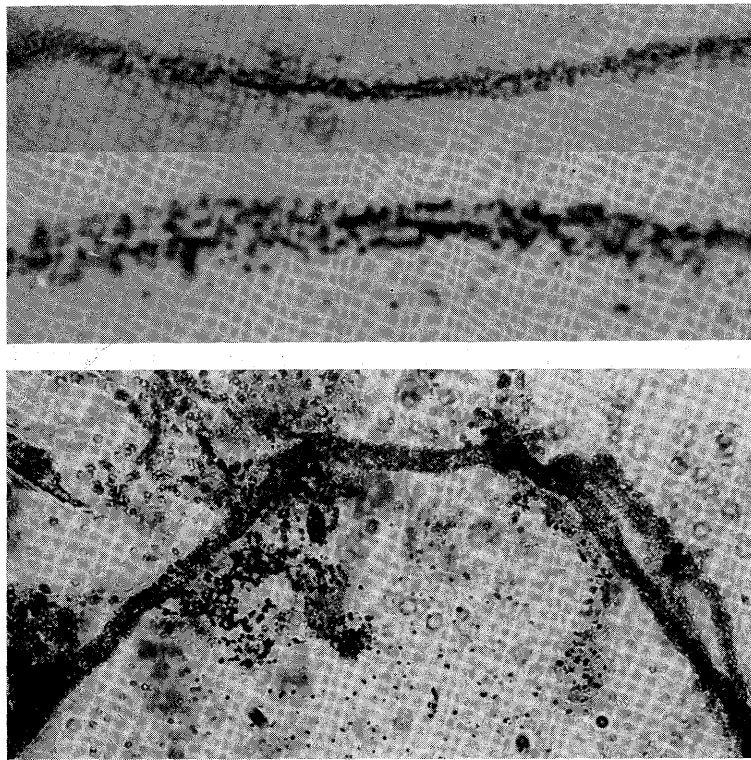


Fig. 3 - Autoradiografie di ife fungine dopo 15 giorni dall'inizio della prova (A) e dopo 20 giorni (B).

Le cromatografie degli acidi organici saponificabili hanno indicato, nelle condizioni sperimentali realizzate, un Rf intorno a 0,40 per i composti marcati, mentre gli altri spots risultavano scarsamente radioattivi o completamente privi di attività.

#### DISCUSSIONE

Quando si sottopone a mineralizzazione i poli- $\beta$ -idrossibutirrato- $^{14}\text{C}$ , si constata che non vi è immediata liberazione di  $^{14}\text{CO}_2$  ma che al contrario la decomposizione per via ossidativa assume valori significativi solo dopo tre settimane. Trascorso tale periodo la demolizione del PHB nel suolo procede con maggiore speditezza, fino a raggiungere, dopo 45 giorni, il valore di circa 65% di prodotto mineralizzato rispetto al pro-

scontrano nel caso della lignina-<sup>14</sup>C, in cui sono necessari 150 giorni per raggiungere un 21,7% di prodotto mineralizzato (MAYAUDON e BATISTIC, 1970); è da notare peraltro che, anche in questo caso, la maggior per-

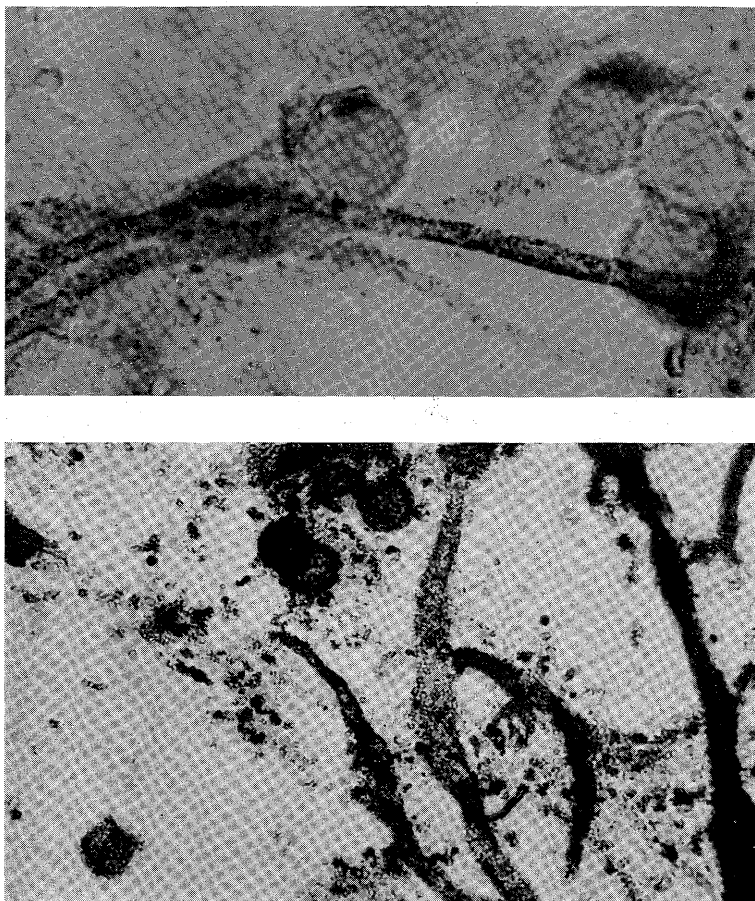


Fig. 5 - Autoradiografie di ife fungine e cellule algali dopo 7-10 giorni dall'inizio della prova (A) e dopo 45 giorni (B). Si noti la presenza di marcature sulle cellule algali solo dopo una incubazione protratta nel tempo.

centuale di mineralizzazione viene conseguita nei primi 30 giorni di saggio.

È noto che il PHB costituisce, almeno nei batteri, un materiale energetico e di riserva facilmente utilizzabile per la cellula (DOUDOROFF e STANIER, 1959; VAN EOL e Coll., 1971); le nostre esperienze nel terreno

dotto iniziale non degradato. Successivamente, si ha un graduale processo di stabilizzazione biologica, dovuto con ogni probabilità all'incorporazione dei prodotti intermedi del metabolismo nella frazione biologica del ter-

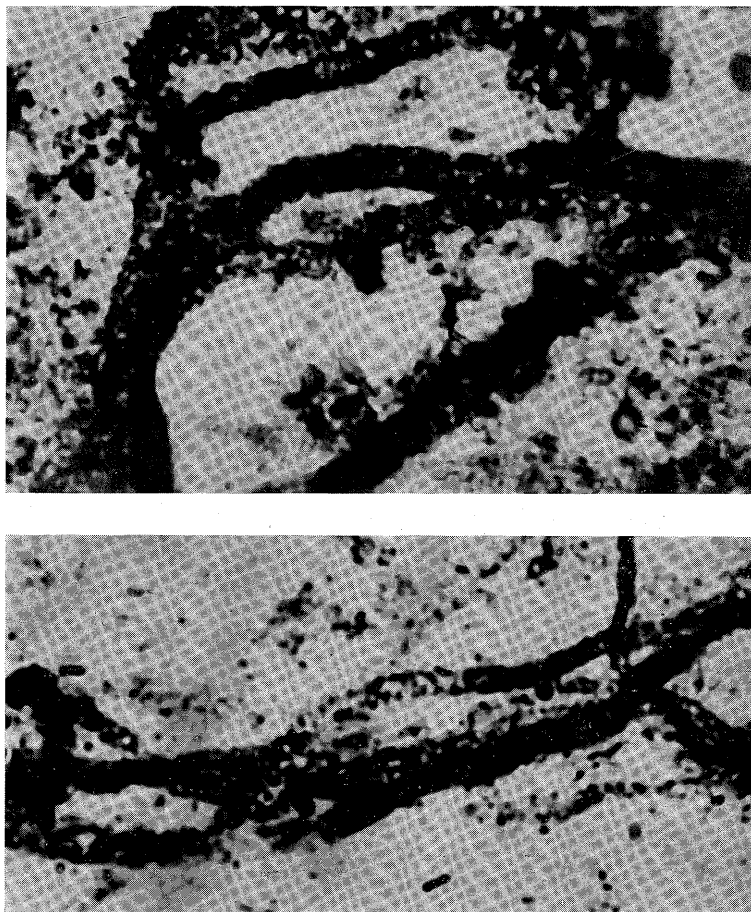


Fig. 4 - Autoradiografie di ife fungine dopo 45 giorni dall'inizio della prova in terreno senza piante (A) ed in presenza di piantine di grano (B).

reno e dell'acqua. La dinamica della mineralizzazione del PHB-<sup>14</sup>C differisce quindi da quella di altre sostanze dinamogene incorporate nel suolo: nel caso del glucosio-<sup>14</sup>C infatti si raggiunge il 76% di prodotto mineralizzato dopo 7 giorni (SIMONART e MAYAUDON, 1958); nel caso della glicina-<sup>14</sup>C l'89,6% dell'aminoacido viene degradato entro i primi 30 giorni (MAYAUDON e SIMONART, 1965), mentre tempi molto lunghi si ri-

sembrano confermare tali dati, salvo precisare che, ai fini della mineralizzazione del suolo, non sono da trascurare due parametri: I) le interazioni tra le micelle del terreno ed il PHB o i prodotti intermedi del suo metabolismo; II) i tempi di induzione degli enzimi esterasici che presiedono alla sua depolimerizzazione ed utilizzazione. Tali parametri potrebbero spiegare, almeno in parte, il notevole ritardo dell'inizio del processo di mineralizzazione. Da notare infine che la degradazione procede in modo differenziale a seconda che nel terreno viva una microflora normale o che lo stesso terreno sia stato sottoposto a trattamenti sterilizzanti e a successiva ricolonizzazione.

Per quanto riguarda la microflora responsabile della degradazione, nonostante che in letteratura siano noti solo enzimi specifici di natura batterica (LUSTY e DOUDOROFF, 1966; GAVARD e Coll., 1967), le nostre esperienze ci consentono di affermare che, nel suolo e nell'acqua, sono soprattutto i micromiceti gli agenti più attivi nei processi di demolizione del PHB. D'altra parte, recentemente sono riferiti dati sperimentali che indicano come nel suolo, anche nel caso in cui vengano addizionati detriti vegetali marcati, le più frequenti marcature, per via autoradiografica, vengono ritrovate nei funghi (GROSSBARD, 1971). Questo argomento ci sembra degno di ulteriori indagini, ed es. ricorrendo ai recenti metodi fluorimetrici di determinazione « in vivo » di attività esterasiche nel suolo (PANCHOLY e LYND, 1971).

La presenza di semi e di piante non sembra influire sul metabolismo del PHB nel suolo, né al livello di spermosfera né a quello di rizosfera. Ciò probabilmente avviene o perché la demolizione, per buona parte, si verifica nella fase acquosa dell'ecosistema acqua-terreno, oppure perché, essendo i funghi i principali agenti di demolizione, è possibile che si tratti di micromiceti non rizosferici.

Ed infine l'incorporazione dei prodotti del metabolismo del PHB nelle varie frazioni estratte dall'ecosistema. In analoghe esperienze, è stato dimostrato che l'incorporazione di acetato- $^{14}\text{C}$  nel terreno si risolve in una attività del 50% del valore iniziale nell'idrolisato acido della frazione *umina* (IVARSON e STEVENSON, 1964). Altre prove con glucosio- $^{14}\text{C}$  hanno portato a risultati non molto diversi (SIMONART e MAYAUDON, 1958), mentre nel caso di incorporazione di glicina-1- $^{14}\text{C}$  nel suolo, la frazione *umina* dopo 30 giorni risulta scarsamente attiva, essendo più attiva la frazione solubile dell'idrolisato acido (MAYAUDON e SIMONART, 1965). Alcune ricerche sulla demolizione della ligina- $^{14}\text{C}$  hanno provato che, dopo cinque mesi, il 60% della radioattività era legata agli acidi umici (MAYAUDON e BATISTIC, 1970); infine l'umificazione diretta di



*Azotobacter*-<sup>14</sup>C, dopo 60 giorni, denota un aumento di radioattività nella frazione insolubile *umina*, contemporanea ad una caduta di attività delle frazioni « acidi fulvici » e « acidi umici » (MAYAUDON e SIMONART, 1963). Le esperienze da noi condotte hanno dimostrato che la radioattività del terreno e dell'acqua si condensa nella frazione oleosa estratta con etere di petrolio in ambiente acido e successivo recupero con alcool metilico. I valori di Rf delle cromatografie e delle autoradiografie fanno pensare che probabilmente trattasi di un acido mono- o di-carbossilico a tre atomi di carbonio. In attesa di ulteriori precisazioni delle indagini che sono ancora in fase di attuazione, possiamo escludere che si tratti dell'acido acetico, che pure potrebbe somigliare per le caratteristiche di comportamento alla cromatografia, al composto da noi individuato; e ciò in quanto l'acido acetico non sarebbe stato concentrabile sotto vuoto. L'esclusione dell'acido acetico sembra in contrasto con il path metabolico finora riconosciuto valido per la demolizione del PHB (SCHLEGEL e GOTTSCHALK, 1962).

Concludendo, ci sembra che i risultati di maggior interesse siano i seguenti: I) la precisazione del tempo di mineralizzazione del PHB; II) la accertata indipendenza del processo di mineralizzazione da fenomeni spermosferici e rizosferici; III) l'accertamento che la demolizione avviene principalmente ad opera dei micromiceti e IV) l'individuazione della frazione acida saponificabile quale frazione in cui si condensa per massima parte la radioattività del prodotto iniziale.

#### RIASSUNTO

In un ecosistema terreno-acqua è stato studiato il metabolismo del poli- $\beta$ -idrossibutirrato-<sup>14</sup>C accumulato da cellule di *Azotobacter chroococcum* Beij. Il composto era sintetizzato a partire dall'acetato-1-<sup>14</sup>C ed ottenuto puro ad un peso molecolare molto elevato.

Nelle condizioni realizzate il 65% circa della radioattività iniziale veniva rilasciata come <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> dopo 45 giorni. Tale percentuale in condizioni di parziale limitazione della microflora, scendeva al 25% circa. I reperti autoradiografici indicavano che i micromiceti sono di gran lunga i più marcati tra i componenti della microflora. La frazione organica sia dell'acqua che del suolo accumulava una certa radioattività localizzata quasi per intero in un componente della frazione acida saponificabile con basso peso molecolare e diverso dall'acido acetico. Il catabolismo nel terreno del PHB, nelle condizioni microbiche naturali, avviene quindi secondo un meccanismo che non rispecchia quello noto per la sintesi.

La presenza nell'ecosistema di semi in germinazione e di plantule di mais, grano e pisello, non ha rilevato alcuna influenza sul metabolismo del PHB.

### SUMMARY

The metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* cells has been studied in a soil-water ecosystem. The PHB- $^{14}\text{C}$  was synthesized from acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$  and its molecular weight, after isolation and purification, was about 200.000.

In the ecosystem realized by us about 65% of the radioactivity was lost as  $^{14}\text{CO}_2$  after 45 days, meanwhile only 25% of the compound was mineralized when soil microflora was partially inhibited. As revealed by radioautography, microfungi accumulated radioactive compounds at a greater extent than other microorganisms. Into organic fractions both of soil and of water, an organic acid with low molecular weight and included in the saponifiable portion, was found to be labelled. This organic acid wasn't acetic acid. In this connection, it seems that the catabolism of the PHB in the soil-water ecosystem, in the presence of natural microflora, follows a pathway other than the synthetic one, ascertained in some individual microorganisms.

The presence in the ecosystem of germinating seeds and seedlings of wheat maize and pea didn't affect the proceedings of PHB metabolism.

### BIBLIOGRAFIA

- ALPER R., LUNDGREN D.E., 1963. — *Properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate*. I. *General considerations concerning the naturally occurring polymer*. Biopolymers, 1, 545.
- BOATMAN E.S., 1964. — *Observations on the fine structure of spheroplasts of Rhodospirillum rubrum*. J. Cell. Biol., 20, 297.
- BROCK P., FUSTEC-MATHON E., NEUVILLE D., RAYNAUD M., GROSSIN F., 1968. — *Considérations critiques sur l'isolement, la détermination et la culture de l'Azotobacter*. Annales Inst. Pasteur, 115, 689.
- DELAFIELD F.P., COOKSEY K.E., DOUDOROFF M., 1965. —  *$\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase and dimer hydrolase of Pseudomonas lemoignei*. J. Biol. Chem., 240, 4023.
- DOMMERMUES Y., MANGENOT F., 1970. — *Ecologie microbienne du sol*. Masson et Cie Ed., Paris, p. 18.
- DOUDOROFF M., STANIER R., 1959. — *The role of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria*. Nature, 183, 1440.
- FORSYTH W.G.C., HAYWARD A.C., ROBERTS J.B., 1958. — *Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria*. Nature, 182, 800.
- GAFFRON H., 1935. — Rif. da Sghlegel H.G., Gottschalk G., 1962.
- GAVARD R., RAYNAUD C., HAUTTECOEUR B., DAHINGER A., 1967. — *Dégradation du lipide  $\beta$ -hydroxybutyrique par un extrait enzymatique de Bacillus megatherium*. III. *Dépolymérase*. B. C. R. Acad. Sci., Paris, 265, ser. D, 1557.
- BRIEBEL R., SMITH Z., MERRICK J.M., 1968. — *Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate*. I. *Purification of native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from Bacillus megatherium*. Biochemistry, 7, 3676.
- GROSSBARD E., 1971. — *The utilization and translocation by microorganisms of carbon-14 derived from the decomposition of plant residues in soil*. J. gen. Microbiol., 66, 339.

- HAYWARD A.C., FORSYTH W.G.C., ROBERTS J.B., 1958. — *Synthesis and breakdown of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by bacteria*. J. gen. Microbiol., 20, 510.
- ISHERWOOD F.A., HANES C.S., 1953. — *Separation and estimation of organic acids on paper chromatograms*. Biochem. J., 55, 824.
- IVARSON K.C., STEVENSON I.L., 1964. — *The composition of radioactive acetate in soils. II. The distribution of radioactivity in soil organic fractions*. Can. J. Microbiol., 10, 677.
- JENSEN T.E., SICKO L.M., 1971. — *Fine structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules in a blue-green alga, Chlorogloea fritschii*. J. Bact., 106, 683.
- JORGENSEN J.R., 1961. — *Studies on the nature and occurrence of organic acid in soils*. Ph. D. Thesis, Univ. Minnesota, Minneapolis.
- KALLIO R.E., HARRINGTON A.A., 1960. — *Sudanophilic granules and lipid of Pseudomonas methanica*. J. Bacteriol., 80, 321.
- LAW J.H., SLEPECKI R.A., 1961. — *Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid*. J. Bacteriol., 82, 33.
- LEMOIGNE M., 1923. — *Production d'acide  $\beta$ -oxybutyrique par certaines bactéries du group du B. subtilis*. C. R. Acad. Sci., Paris, 176, 1761.
- LEMOIGNE M., 1964. — *Fermentation  $\beta$ -hydroxybutyrique*. Helv. Chim. Acta, 29, 1303.
- LEMOIGNE M., GIRARD H., 1943. — *Reserves lipidiques  $\beta$ -hydroxybutyriques chez Azotobacter chroococcum*. C.R. Acad. Sci., Paris, 217, 577.
- LEMOIGNE M., GRELET N., CROSON M., LE TERIS M., 1945. — *Formation de lipide  $\beta$ -hydroxybutyrique aux dépens du glucose par le Bacillus megatherium. Données quantitatives*. Boll. Soc. Chim. Biol., Paris, 27, 90.
- LEPIDI A.A., NUTI M.P., de BERTOLDI M., 1972. — *Apparatus for the determination of the metabolism of strongly persistent compounds in a soil-water ecosystem*. Biologie du Sol, in corso di stampa.
- LEVINE H.B., WOLOCHOW H., 1960. — *Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in Pseudomonas pseudomallei*. J. Bacteriol., 79, 395.
- LUNDGREN D.G., ALPER R., SCHNAITMAN C., MARCHESSAULT R.H., 1965. — *Characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria*. Bacteriol., 89, 245.
- LUSTY C.J., DOUDOROFF M., 1966. — *Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate depolymerases of Pseudomonas lemoignei*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 960.
- MACRAE R.M., WILKINSON J.F., 1958. — *Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspension of Bacillus cereus and Bacillus megatherium*. J. gen. Microbiol., 19, 210.
- MAYAUDON J., BATISTIC L., 1970. — *Dégradation biologique de la lignine  $^{14}\text{C}$  dans le sol*. Annales Inst. Pasteur, 118, 191.
- MAYAUDON J., SIMONART P., 1963. — *Humification des microorganismes marqués par  $^{14}\text{C}$  dans le sol*. Annales Ins. Pasteur, 105, 257.
- MAYAUDON J., SIMONART P., 1965. — *Metabolisme de la glycine  $^{14}\text{C}$  dans le sol*. Annales Inst. Pasteur, 109, 224.
- MERRICK J.M., DOUDOROFF M., 1961. — *Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacteria*. Nature, 189, 890.
- MERRICK J.M., LUNDGREN D.E., PFISTER R.M., 1965. — *Morphological changes in PHB granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis*. J. Bacteriol., 89, 204.
- NEUJAHN H.Y., EWALLSON B., 1964. — *Counting of  $\beta$ -emitters in bacterial cells by means of the liquid scintillation method*. Analytical Biochem., 8, 487.

- NUTI M.P., DE BERTOLDI M., LEPIDI A.A., 1972. — *Influence of phenylacetic acid on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in Azotobacter chroococcum Beij. Can. J. Microbiol*, 18 (in stampa).
- NUTI M.P., DE BERTOLDI M., LEPIDI A.A., 1972. — *A simple of extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from aerobic and anaerobic soil bacteria. Biologie du Sol*, 15 (in stampa).
- OSUGI S., AOKI M.J., rif. in *Soil Biochemistry*, 1967, A.D. McLaren e G.H. Peterson Ed., Dekker Inc. New York, p. 124.
- PANCHOLY S.K., LYND J.Q., 1971. — *Microbial esterase detection with ultraviolet fluorescence. Appl. Microbiol.*, 22, 939.
- POSTGATE J.R., 1967. — *Soil bacteria parasitic on Azotobacteriaceae. Ant. van Leeuw.*, 33, 113.
- PRESCOTT S.C., DUNN C.G., 1959. — *Industrial Microbiology*. 3<sup>a</sup> ed., N.Y., Mc Graw-Hill Co.
- ROUF M.A., STOKEES J.L., 1962. — *Isolation and identification of the sudanophilic granules of Sphaerotilus natans. J. Bacteriol.*, 83, 343.
- SCHLEGEL H.G., GOTTSCHALK G., 1962. — *Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure, ihre verbreitung, funktion und biosynthese. Angew. Chem.*, 74, 342.
- SCHLEGEL H.G., GOTTSCHALK G., von BARTHA R., 1961. — *Formation and utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (Hydrogenomonas). Nature*, 191, 463.
- SCHWARTZ S.M., VARNER J.E., MARTIN W.P., 1954. — *Separation of organic acids from several dormant and incubated Ohio soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 18, 174.
- SENIOR P.J., DAWES E.A., 1971. — *The role and the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis in Azotobacter beijerinckii. Biochem. J.*, 123, 29P.
- SIERRA G., GIBBONS N.E., 1962. — *Role and oxydation pathway of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in Micrococcus halodenitrificans. Can. J. Microbiol.*, 8, 255.
- SIMONART P., MAYAUDON J., 1958. — *Etude de la décomposition de la manière organique dans le sol au moyen du carbon radioactif. I. Cynétique de l'oxydation en CO<sub>2</sub> de divers substrats radioactifs. Plant and Soil*, 9, 367.
- SLEPECKI R.A., LAW J.H., 1960. — *The role of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in the sporulation of Bacillus megatherium. Bacteriol. Proc.*, 1960, 64.
- SLEPECKI R.A., LAW J.H., 1961. — *Synthesis and degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of Bacillus megatherium. J. Bacteriol.*, 82, 37.
- SMITHIES W.R., GIBBONS N.E., BAYLEY S.T., 1955. — *The chemical composition of the cell and cell wall of some halophilic bacteria. Can. J. Microbiol.*, 1, 505.
- STEWART J.R., BROWN R.M., 1971. — *Algicidal nonfruiting Myxobacteria with high G+C ratios. Arch. Mikrobiol.*, 80, 176.
- STOCKDALE H., RIBBONS D.W., DAWES E.A., 1968. — *Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the Azotobacteriaceae. J. Bacteriol.*, 95, 1798.
- STOLP H., STARR M.P., 1963. — *Bdellovibrio bacteriovorus gen. et sp. n., a predatory ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. Ant. van Leeuw.*, 29, 217.
- STOKES J.L., PARSON W.L., 1968. — *Role of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in survival of Sphaerotilus discophorus during starvation. Can. J. Microbiol.*, 14, 785.
- TOBBACK P., LAUDELOUT H., 1965. — *Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in Nitrobacter. Biochim. Biophys. Acta*, 97, 589.

- VAN EOOL A.P., TOBBACK P.P., FISCHER I., 1971. — *Autotrophic growth and synthesis of reserve polymers in Nitrobacter winogradskyi*. Arch. Mikrobiol., 76, 252.
- WANG W.S., LUNDGREN D.G., 1969. — *Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium Ferrobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol., 97, 974.
- WATSON S.W., WATERBURY J.B., 1971. — *Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria Nitrospina gracilis n. gen. n. sp. and Nitrococcus mobilis n. gen., n. sp.* Arch. Mikrobiol., 77, 203.
- WEBLEY D.M., DUFF R.B., 1965. — *The incidence, in soils and other habitats, of microorganisms producing 2-ketogluconic acid*. Plant and Soil, XXII, 307.
- WEBLEY D.M., DUFF R.B., FARMER V.C., 1956. — *Evidence for  $\beta$ -oxydation in the metabolism of saturated aliphatic hydrocarbons by soil Nocardias*. The Macauley Ins. for Soil Res., Aberdeen.
- WILLIAMSON D.H., WILKINSON J.F., 1958. — *The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of Bacillus species*. J. gen. Microbiol., 19, 198.
- YARDLEY H.Y., 1964. — *Simplified scintillation-counting technique for assaying  $^{14}\text{CO}_2$  in a Warburg flask*. Nature, 204, 281.

CENTRO DI STUDIO DEI MICRORGANISMI AUTOTROFI DEL C.N.R.  
PRESSO L'ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA  
DELL'UNIVERSITÀ DI FIRENZE

*Direttore:* Prof. GINO FLORENZANO

W. BALLONI - D. RICCI

PRODUZIONE DI VITAMINA B<sub>12</sub>  
DA PARTE DI CEPPI EFFICACI DI RHIZOBIUM

I ceppi di batteri simbiotici delle leguminose sono, come è noto, tra i microrganismi maggiormente stimolati nella rizosfera delle leguminose e specialmente dalle specifiche piante ospiti che possono infettare. Secondo ROVIRA (1961) tale stimolo si verifica a distanza di 10-20 mm. dalla superficie radicale.

È pure noto che i rizobi sono capaci di sintetizzare più o meno grandi quantità di sostanze biologicamente attive (Vitamine del gruppo B, fito-ormoni, etc.). Perciò i rizobi, oltre che simbiotici, si devono considerare tra i batteri che maggiormente possono popolare la rizosfera (BROWN e coll., 1968). Non è ancora noto quale componente degli essudati radicali delle leguminose è lo specifico stimolante del batterio, ma si sa che gli essudati radicali delle leguminose sono differenti dal punto di vista quantitativo e qualitativo da quelli di altre famiglie di piante.

Non è noto, inoltre, il perché dense popolazioni di rizobi si stabiliscano nella stessa rizosfera delle leguminose, dato che un nodulo si può formare a partire da una singola infezione. Ad ogni modo è accertata l'esistenza di una stretta correlazione tra densità di rizobi e di infezioni, e il numero di noduli formati sulla pianta ospite.

Di recente SHEMAKHANOVA e SIDORENKO (1970) hanno considerato la possibilità di selezione di ceppi efficaci di rizobi in base al contenuto di essi in vitamina B<sub>2</sub> e B<sub>12</sub>. Dai risultati di questa ricerca gli AA. concludono che esiste una netta correlazione tra quantità di vitamine sinte-

tizzate e capacità azotofissatrice dei ceppi determinata in base al contenuto in azoto delle piante nodulate con i medesimi ceppi batterici.

Prendendo spunto da tali conclusioni si è voluto, nella presente nota, considerare, per i ceppi esistenti nella collezione dell'Istituto e di nota efficacia, la produzione di B<sub>12</sub> che è un carattere importante nella definizione delle attività biochimiche dei rizobi. La determinazione della B<sub>12</sub> fu effettuata in parallelo con *Escherichia coli* mutante 113/3 e con *Euglena gracilis* ceppo Z.

Il saggio venne condotto con il metodo delle piastre di agar messo a punto da FESCE (1956) e PACINI per *Escherichia coli* 113/3. Furono impiegate piastre quadrate di 23 x 23 cm. di lato, di materiale plastico, sterilizzate per 45'-60' con raggi ultravioletti e nelle quali era possibile praticare fino a un massimo di 36 pozzetti.

In breve, la procedura consisteva nel seminare alla superficie del mezzo di Davis (Biolife) l'organismo test. Una volta che la superficie si era asciugata, si asportavano, a tutto spessore, dei cilindretti di agar del diametro di 6 mm.; nel pozzetto così ottenuto si introducevano 0,1-0,2 ml. del liquido da titolare costituito da estratti di cellule di *Rhizobium* disintegrate meccanicamente e diluite in modo opportuno. Per ogni estratto cellulare vennero saggiate due diluizioni, ognuna delle quali fu introdotta in 6 pozzetti, secondo lo schema del quadrato latino. In ogni piastra, parallelamente agli estratti cellulari, furono saggiate anche soluzioni di vitamina B<sub>12</sub> pura a titolo noto.

Per rendere meglio evidenti gli aloni di crescita dell'organismo test, nell'agar venne introdotta una soluzione di trifetil-tetrazolio-cloruro (T.T.C.) a concentrazione finale di 200 ppm in presenza del quale la patina dell'*Escherichia coli* 113/3 assume un colore rosso intenso.

Il saggio con *Euglena gracilis* ceppo Z venne condotto con una tecnica ricavata da quella sopra menzionata apportandovi le necessarie modifiche, che hanno riguardato principalmente il mezzo di coltura (Bacto-Euglena B<sub>12</sub> medium Difco), le modalità di semina dell'organismo test e dell'incubazione, effettuata in cella termoluminostatica.

Confrontando i due metodi di determinazione della vitamina B<sub>12</sub> impiegati, siamo pervenuti alla conclusione che *Euglena gracilis* ceppo Z offre, rispetto al mutante *Escherichia coli* 113/3, alcuni vantaggi, che sono essenzialmente una sensibilità 10-30 volte superiore ed una maggiore specificità.

Il saggio con *Escherichia coli* 113/3 ha fornito valori superiori a quelli ottenuti con *Euglena gracilis* ceppo Z. Questa discordanza trova spiegazione nel fatto che *Escherichia coli* 113/3 risponde ad un maggior

numero di analoghi e precursori della cianocobalamina rispetto all'*Euglena gracilis* ceppo Z.

Limitando l'esame ai dati ottenuti con *Euglena gracilis* ceppo Z, si è notato che il contenuto in vitamina B<sub>12</sub> varia da specie a specie e, nella stessa specie, da ceppo a ceppo. Solo 5 ceppi di *Rhizobium leguminosarum* hanno mostrato una marcata costanza di comportamento, poiché la produzione di B<sub>12</sub> ha oscillato tra 8,4 e 15,2 µg/g di sostanza secca. Viceversa, nelle altre specie saggiate, si è riscontrata una notevole variabilità:

Tab. 1. - Produzione di vitamina B<sub>12</sub> ed analoghi da parte di vari ceppi efficaci di specie di *Rhizobium* (µg/g di peso secco).

Organismo	Organismo test	
	<i>Euglena gracilis</i> ceppo Z	<i>Escherichia coli</i> 113/3
<i>Rb. leguminosarum</i>		
ceppo 1	0,47	8,40
ceppo 3	—	12,2
<i>Rb. japonicum</i>		
ceppo 1	0,15	3,4
ceppo 2	2,5	9,2
<i>Rb. lupini</i>		
ceppo 1	—	0,3
<i>Rb. meliloti</i>		
ceppo 5	0,25	1,25
ceppo 15	4,4	36
<i>Rb. phaseoli</i>		
ceppo 1	0,4	12,1
<i>Rb. trifolii</i>		
ceppo 14	0,07	0,3
ceppo 23	0,39	11,8
<i>Rb. della Vigna sinensis</i>		
ceppo 1	—	1,56
ceppo 2	—	0,34
<i>Rb. sp.</i>		
ceppo 35	1,30	21,5
ceppo 28	0,09	2,6



ad esempio, in *Rhizobium meliloti* la produzione di B<sub>12</sub> ha oscillato tra 1,5 e 36 µg/g di sostanza secca e in un gruppo di 13 ceppi efficaci isolati da varie leguminose erbacee ed arbustive, la produzione di B<sub>12</sub> ha oscillato tra 2,6 e 21,5 µg/g di sostanza secca.

In conclusione, le forti oscillazioni riscontrate nel contenuto di vitamina B<sub>12</sub> dei ceppi efficaci di *Rhizobium* dimostrano che la correlazione fra efficacia e produzione di vitamine dei ceppi di rizobi non è valida, almeno per quanto riguarda la vitamina B<sub>12</sub>.

Quest'aspetto della fisiologia dei rizobi che, a parte la loro fisionomia di simbionti, sono indubbiamente tipici microrganismi rizosferici e formano dense popolazioni nella zona radicale delle leguminose, è particolarmente sopravvalutato in un'ipotesi enunciata da SANTSEVICH, il quale sostiene che i batteri simbionti incapaci di attivare la crescita delle piante sono scarsamente attivi anche nella fissazione di azoto atmosferico.

Nella concezione del SANTSEVICH, addirittura, la capacità di sintetizzare sostanze biologicamente attive assume un ruolo di preminente importanza sulla stessa attività azotofissatrice. Anche il beneficio che le leguminose esercitano per le colture non leguminose che seguono nella rotazione, sarebbe da ricondurre agli effetti stimolanti esercitati dalla residua popolazione di rizobi. Tale ipotesi, sperimentalmente non verificata, appare infondata anche alla luce dei dati delle nostre ricerche. Pertanto il problema della correlazione tra l'efficacia e le altre proprietà fisiologiche e biochimiche dei rizobi resta ancora aperto.

#### RIASSUNTO

È stato osservato che ceppi efficaci di *Rhizobium* spp. differiscono largamente per quanto concerne la produzione di vitamina B<sub>12</sub>. Data l'assenza di correlazione fra produzione di vitamina B<sub>12</sub> ed efficacia, è evidente che l'attitudine a produrre vitamina non ha influenza alcuna (almeno per quanto riguarda la vit. B<sub>12</sub>) sulle proprietà simbiotiche dei rizobi.

#### SUMMARY

It has been shown that effective strains of *Rhizobium* spp. vary widely in their ability to synthesize vitamin B<sub>12</sub>.

Since the amount of vitamin B<sub>12</sub> produced by the strains examined is not related to their effectiveness, it is evident that vitamin production (at least with regard to vit. B<sub>12</sub>) has not any influence on the symbiotic properties of root-nodule bacteria.

BIBLIOGRAFIA

- BROWN E.M., JACKSON R.M. e S.K. BURLINGHAM - *Growth and effects of bacteria introduced into soil*. In: Gray T.R.G. e Parkinson D. (Edit.). - *The Ecology of soil bacteria*. pp. 531-551, Liverpool Univ. Press (1968).
- FESCE A. - *Dosaggio microbiologico di vitamina B<sub>12</sub>*. Boll. Ist. Sierot. Mil., 35, 368 (1956).
- ROVIRA A.D. - *Rhizobium numbers in the rhizosphere of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi*. Aust. J. Agr. Res., 12, 77 (1961).
- SHEMAKHANOVA N.M. e O.D. SIDORENKO - *Possibility of selection of active strains of Rhizobium according to the content of riboflavin and cobalamin in pure cultures*. Microbiology, 29, 905-908 (1970).

ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA  
DELLA UNIVERSITÀ DI NAPOLI

S. COPPOLA - G. PERCUOCO - A. ZOINA - G. PICCI

EFFETTO DI CITOCHININE SINTETICHE E NATURALI  
SULLO SVILUPPO MICROBICO

La presenza di citochinine nei microrganismi è stata dimostrata da vari Autori in diverse specie microbiche (KLÄMBT et al., 1966; BIEMANN et al., 1966; SKOOG et al., 1966; MILLER, 1967; KLÄMBT, 1967; COPPOLA e GIANNATTASIO, 1968; SKOOG e LEONARD, 1968; PETERKOFKY, 1968; FITTLER et al., 1968; BURROWS et al., 1969; HASHIMOTO et al., 1969; BLONDEAU, 1970), ma la loro funzione non è ancora ben conosciuta. SKOOG e ARMSTRONG (1970) attribuiscono fondamentale importanza alla localizzazione di queste sostanze in determinate specie di tRNA: esse infatti sono state rinvenute, in posizione adiacente all'anticodone, nei tRNA specifici della fenilalanina, della leucina, della serina, della tirosina, della cisteina e del triptofano, tutti « riconoscenti » codoni iniziati con la lettera U (uracile). Questi stessi Autori considerano i risultati riferiti da GEFTER e RUSSELL (1969) una convincente dimostrazione della funzione regolatrice che le citochinine possono svolgere nella sintesi proteica a livello della traduzione, rafforzando significativamente, con la loro presenza, la capacità dei tRNA di combinarsi con i complessi mRNA-ribosomi. Attualmente tuttavia, numerose argomentazioni si pongono in contraddizione con questa ipotesi, data anche la particolare specificità del materiale biologico impiegato da Gefter e Russell nei loro esperimenti (le loro indagini sono state eseguite su tre tipi di tRNA della tirosina, non tutti contenenti citochinine, che vengono prodotti in *E. coli* a seguito di infezione col fago trasduttore Ø 80). Da un punto di vista prettamente biofisico, HALL (1971) sostiene che il radicale isopentenilico presente su alcuni tRNA potrebbe servire per mantenere l'integrità della interazione complementare fra il codone e l'anticodone, ma potrebbe anche disturbarla, fino a produrre un'anormale « codon recognition ». Alternativa-

mente, certi tRNA, provvisti di citochinine, potrebbero essere specifici per la sintesi di determinate molecole proteiche: ipotesi questa affascinante, data l'altissima reattività del radicale isopentenilico, ma che conduce ad un enorme aumento del numero di tRNA necessari alla fisiologia della cellula. Per definizione, infatti, i tRNA sono specifici per ciascun aminoacido; se diventano anche specifici per la proteina che in ogni dato momento deve essere sintetizzata, il loro numero potenziale è virtualmente illimitato. Varie evidenze sperimentali inoltre si sono accumulate a dimostrazione dell'azione svolta dalle citochinine al di fuori dei tRNA, cioè come basi o nucleosidi liberi (KENDE e TAVARES, 1968; SHAW et al., 1968; MATHYSSE e ABRAMS, 1970; JOHNSON et al., 1970; BERRIDGE e RALPH, 1970; COPPOLA et al., 1971; LITWACK e PETERKOFISKY, 1971; ROUSSAUX e HEIM, 1971), al punto che oggi, se si può dare per certo il tRNA come sito della sintesi delle citochinine (PETERKOFISKY, 1968; FITTLER et al., 1968; KLINE et al., 1969; BARTZ e coll., 1970), il loro sito primario di azione, il preciso loro significato nella biochimica cellulare dei microrganismi, non può dirsi ancora definibile.

Il meccanismo di azione delle citochinine è oggetto di studio anche nel nostro laboratorio. Il loro ruolo nella fisiologia della cellula microbica è argomento delle nostre attuali ricerche. Qui riferiamo sull'effetto di citochinine sintetiche e naturali sullo sviluppo di diversi microrganismi, mentre lavori in via di completamento riguardano l'effetto su alcuni aspetti del metabolismo microbico.

Citochinine sintetiche, specialmente la chinatina, sono state già saggiate da vari Autori su alcuni microrganismi.

Già nel 1957 SUPNIEWSKI ed Altri studiarono le proprietà biologiche della chinatina e della tiocinetina (alfa-tienilometiladenina), su alcuni schizomiceti (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*), su *Saccharomyces cerevisiae* e su *Aspergillus niger*, dimostrando l'assenza di qualsiasi effetto da parte della chinatina sulla crescita dei batteri, contrapposta ad un lieve stimolo esercitato sul lievito e sull'eumicete, specie se coltivati in un mezzo sintetico. Inibente risultò la tiocinetina.

KENNEL nel 1960 ottenne risultati contrari, registrando piccole ma riproducibili differenze (in termini di stimolo) nelle curve di crescita di *E. coli*, anche rispetto ad un controllo con adenina ed evidenziando una inibizione della chinatina in sinergia con l'acido  $\beta$ -indolacetico in *Sacch. cerevisiae* e *Schizosacch. pombe*. Secondo MARUZZELLA e GARNER (1963) invece, concentrazioni da  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  M di chinatina, possono essere stimolanti per *Bac. megaterium*, *E. coli*, *Staphyl. aureus*, *Erwinia carotovora* e

*Agrobact. tumefaciens*. QUINN e Coll. (1963) inoltre hanno osservato che 1  $\gamma$  per litro di chinetina può sostituire l'estratto di lievito in un mezzo basale sintetico perché si abbia sviluppo e cellulolisi da *Clostridium thermocellum*. Chinetina ed un'altra citochinina sintetica, la N<sup>6</sup>-benziladenina, sono state saggiate infine da ROMANOW, KAISER e POCHON (1969) sulla crescita, che è apparsa influenzata, e sulla formazione di pigmenti, rimasta senza variazioni qualitative, di *Rhodospirillum rubrum*.

A tutt'oggi, per quel che ci risulta, nessuna citochinina naturale, in forma di base o di nucleoside, è stata mai saggiata sui microrganismi.

#### MATERIALI E METODI

*Citochinine*: Chinetina e N<sup>6</sup>-Benziladenina sono state impiegate come prodotti della Fluka AG; come N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenina (2ip) è stato impiegato un campione sintetizzato dal Dr. KLÄMBT della Università di Bonn fino a quando non è stato disponibile in commercio il prodotto 6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalliladenina della Sigma Chem. Co.; N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenosina (IPA) è stata sintetizzata dal Dr. GERMANO del nostro Istituto, secondo lo schema di HALL et al. (1966); infine sono stati impiegati zeatina e zeatin-riboside della Calbiochem.

*Microrganismi*: i saggi sono stati eseguiti sui seguenti microrganismi: *Azotobacter chroococcum*, ceppo N° 28 della collezione IMAUN; *Bacillus subtilis*, ceppo N° 6633 della ATCC; *Clostridium thermocellum* coltura mista M+E, inviatoci dal Dr. QUINN della Yowa State University; *Escherichia coli* B/b, ceppo Benzen, fornitoci dall'IIGB di Napoli; *Nitrosomonas europaea*, ceppo N° 19718 della ATCC; *Mycoplasma sp.* (Kid.), inviatoci dal Prof. SÖLL della Yale University; *Pseudomonas fluorescens*, ceppo N° 13525 della ATCC e *Rhizobium leguminosarum*, ceppo N° 10004 della ATCC, fra gli schizomiceti. *Candida utilis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaryomyces guilliermondii*, *Schizosacch. octosporus*, *Schizosacch. pombe*, *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis*, *Hanseniaspora viniae*, *Hansenula anomala*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulopsis coralina*, *Torulopsis famata*, *Lypomyces starkeyi*, *Cryptococcus laurentii*, *Kloeckera apiculata*, *Endomycopsis sp.*, tutti della collezione IMAUN; *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* ceppo N° 20 Castelli, *Candida stellatoidea*, ceppo C 33 della collezione dell'Ist. di Microbiologia agraria dell'Univ. di Pisa, sono stati impiegati fra i lieviti. Saggi infine sono stati eseguiti con *Aspergillus niger* ceppo N° 6275 della ATCC.

*Generalità sull'esecuzione dei saggi:* tutti i saggi sono stati eseguiti in mezzo liquido, impiegando substrati nutritivi appropriati alle specie microbiche in istudio. Le diverse citochinine sono state saggiate alle concentrazioni da  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$  M, realizzate, nei mezzi colturali, partendo da soluzioni « stock »  $10^{-4}$  M sterilizzate per filtrazione. Controlli sono stati eseguiti, oltre che nei semplici substrati senza citochinine, anche impiegando concentrazioni da  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$  M di adenina. Le colture sono state incubate a  $65^{\circ}\text{C}$  per *Clostridium thermocellum*; a  $37^{\circ}\text{C}$  per *E. coli* e per *Mycoplasma sp.* (Kid.); a  $28^{\circ}\text{C}$  per tutte le altre specie. Sono state inoltre realizzate varie condizioni colturali: colture statiche, colture con agitazione magnetica, colture con insufflazione di aria sterile, colture anaerobiche per il *Clostridium*. Lo sviluppo microbico è stato generalmente apprezzato fotometricamente o eseguendo le colture direttamente in biofotometro registratore (Termotorbidimetro aereato TECS a 5 unità); ma sono anche state eseguite conte dirette microscopiche con camera Petroff Houser. Nel caso di *Nitrosomonas europaea* è stata valutata la produzione di  $\text{NO}_2$  nel liquido di Barthel (FORMISANO, 1956) secondo Peter Griess. La crescita di *Aspergillus niger* è stata invece apprezzata gravimetricamente.

Le metodologie particolari, in qualche caso impiegate, saranno indicate coi risultati degli esperimenti.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas europaea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*: per nessuna di queste specie microbiche è stato registrato alcun effetto sulla crescita da parte delle citochinine. Ad una lieve inibizione manifestata dalla adenina, ha sempre corrisposto, nei nostri esperimenti, una costante indifferenza nei riguardi delle sostanze saggiate, anche quando, disponibili i ribosidi del 2ip e della zeatina, le prove sono state ripetute ed estese a questi composti, considerando, con HALL (1971), che per alcuni sistemi biologici, la forma di riboside potesse essere più adatta.

*Clostridium thermocellum*: non soltanto la chinetina, come osservarono QUINN e Coll. (L. C.), ma anche la benziladenina, la  $\text{N}^6$ -( $\Delta^2$ -isopen-tenil) adenina e la zeatina, possono sostituire l'estratto di lievito nel mezzo di coltura di questo germe. La cellulosa in polvere aggiunta al substrato è apparsa decomposta in 4-5 giorni alle concentrazioni  $10^{-6} \div 10^{-8}$  M di citochinine. Questo può essere considerato un caso tipico di attività citochinica in una coltura schizomicetica. In questo sistema infatti tutti gli

altri fattori sono definibili e non-limitanti per lo sviluppo e per le attività delle cellule microbiche, per i quali debbono invece essere presenti citochinine pure o, in alternativa, estratto di lievito. La coltura mista M+E inviataci dal Dr. Quinn non si comporta però in maniera quantitativamente riproducibile. Una valutazione quantitativa dello sviluppo e della cellulolisi è inoltre apparsa abbastanza laboriosa ed approssimativa. Le nostre speranze pertanto di poter mettere a punto una tecnica di dosaggio microbiologica delle citochinine mediante *Clostridium thermocellum* sono andate deluse.

*Mycoplasma sp.* (Kid): su questo ceppo SÖLL e Coll. stanno eseguendo studi interessantissimi: essi hanno già accertato (HAYASHI et al., 1969; BARTZ et al., 1970) che l'acido ribonucleico solubile ottenibile da questa specie ha le identiche proprietà di quello estraibile da *E. coli*, ma, a differenza di quest'ultimo, è pressoché privo di nucleosidi minori con assoluta assenza di N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenosina. Noi abbiamo richiesto questa coltura al Prof. Söll in particolare per ricercarne le eventuali citochinine « libere », ed i risultati saranno pubblicati prossimamente; ma abbiamo anche saggiato l'effetto delle citochinine sulla crescita. Nella tavola N° 1 sono riportate le D. O. delle colture dopo 48 ore a 37°C nel substrato di RAZIN et al. (1965) addizionato di 10 ml/l di PPLO Serum Fraction della Difco. Come è evidente dai risultati riportati, questo microrganismo, incapace di sintetizzare nucleosidi minori con attività citochinica, è sensibile alla loro presenza nel mezzo, in forma di basi nucleiche e specie alla concentrazione 10<sup>-6</sup> M. Esso non si sviluppa

Tav. 1. — D.O.<sub>605</sub> delle colture di *Mycoplasma sp.* (Kid) nel substrato di Razin e coll. (1965) dopo 36 ore di incubazione a 37°C, in presenza di adenina e di diverse citochinine.

Sostante saggiate	Concentrazioni (M)				
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
Adenina	0,143	0,127	0,097	0,097	0,096
Chinetina	0,070	0,325	0,090	0,083	0,073
N <sup>6</sup> -Benziladenina	0,065	0,300	0,110	0,110	0,076
2iP	0,135	0,296	0,105	0,075	0,075
IPA	0,078	0,076	0,075	0,076	0,073
Zeatina	0,095	0,135	0,090	0,080	0,070
Zeatin-riboside	0,083	0,072	0,075	0,070	0,070

in substrati sintetici e meno complessi di quello impiegato, nei quali il responso delle citochinine apparirebbe, molto probabilmente, accentuato.

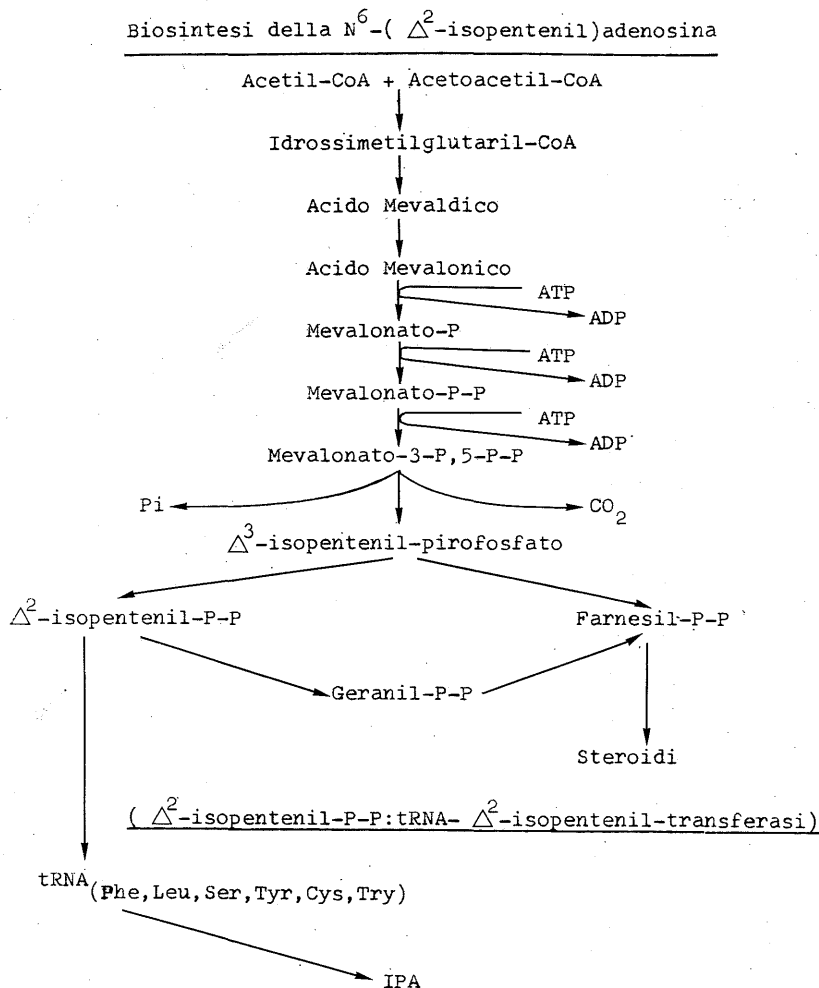
*Escherichia coli* B/b: questo è un ceppo scelto fra i « wild type » di *E. coli* per la completezza delle sue capacità biosintetiche: a 37°C, in « M 9 salts medium » (contenente glucosio come sorgente d'energia,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  come sorgente d'azoto e sali minerali), in 3 ore produce circa  $1,5 \times 10^8$  cellule/ml. Aggiungendo tuttavia al mezzo di coltura le diverse citochinine alle varie concentrazioni indicate, non si ottengono che piccole modificazioni della curva di crescita (lieve accorciamento della « lag-phase », alla concentrazione  $10^{-7}$  M). In corrispondenza della fase stazionaria le diverse condizioni sperimentali si pareggiano. L'adenina esercita una lieve inibizione.

Le diverse prove biofotometriche effettuate hanno quindi mostrato un effetto davvero molto ridotto delle citochinine su *E. coli*, anche impiegando un substrato nutritivo « minimo ».

Da *E. coli* sono state isolate sostanze con attività citochinica (BURROWS et al., 1969). Evidentemente esse sono normalmente sintetizzate dal microrganismo in quantità sufficienti al fabbisogno, risultando in pratica nullo l'effetto di un apporto esogeno. A tutt'oggi tutti i tentativi di isolare mutanti IPA<sup>-</sup> da *E. coli* B sono falliti e KENDE e TAVARES (1968) hanno calcolato che le probabilità di ottenere un tale mutante, che sarebbe estremamente utile nello studio del meccanismo molecolare d'azione delle citochinine, sono bassissime. Noi abbiamo fatto ricorso ad un altro metodo per ottenere cellule di *E. coli* deficienti in IPA e quindi mostranti una certa sensibilità alla presenza, nel mezzo, di citochinine esogene: gli studi di PETERKOFSKY (1968) hanno dimostrato che il radicale isopentenilico dell'IPA deriva dall'acido mevalonico, precursore anche di altre sostanze (come mostrato nella tavola N° 2) oltre che del  $\Delta^2$ -isopentenil-pirofosfato, composto direttamente interessato alla alchilazione delle adenine adiacenti agli anticodoni di alcuni tRNA (quelli appunto provvisti di IPA). La via metabolica di sintesi del  $\Delta^2$ -isopentenil-pirofosfato è risultata regolata *in vivo* (SIPERSTEIN e FAGAN, 1966; DORSEY e PORTER, 1968; SMITH e SMITH, 1970) da meccanismi di controllo del tipo « feedback inhibition » a carico di alcuni dei metaboliti che essa comprende, come il geraniolo, il farnesolo ed il colesterolo. Quest'ultimo è risultato stimolare la crescita del nostro ceppo di *E. coli*: è stato così escluso dai nostri esperimenti. Non così i primi due composti, che provocano invece un'inibizione della crescita netta e proporzionale alla loro concentrazione,



Tav. 2.



come appare nella tavola N° 3. Nella stessa tabella sono riportati anche i risultati ottenuti aggiungendo al mezzo di coltura concentrazioni crescenti non soltanto di geraniolo o farnesolo ma anche di N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenil) adenina, risultati che evidenziano una tipica « competizione » fra queste sostanze.

Soltanto quindi « forzando » la coordinazione delle regolazioni metaboliche è possibile, in *E. coli*, assistere ad un effetto delle citochinine eso-

gene. La stessa influenza di queste sostanze su singole attività metaboliche, il cui studio è in progresso nel nostro laboratorio, è alquanto impedita *in vivo*, cioè nelle condizioni in cui queste attività sono coordinatamente controllate dai meccanismi cellulari di regolazione. Tipica ed interessantissima conferma in merito è stata ottenuta ricercando l'effetto della isopenteniladenina sulla replicazione del colifago T<sub>4</sub> (COPPOLA e MARINO, lavoro in via di completamento): lo « shut-off » delle funzioni di *E. coli*, che segue l'infezione fagica, consente un marcato effetto (vedi tavola N° 4) della citochinina sulla replicazione del genoma fagico.

Tav. 3. — Effetto di geraniolo, Farnesolo e N<sup>6</sup>-(Δ<sup>2</sup>-isopentenil) adenina sulla crescita di *E. coli* B/b.

D.O. <sub>605</sub> delle colture in « M 9 salts medium » dopo 2h 30'				
Geraniolo 2 mg%		0,973	Farnesolo 2 mg%	1,000
»	+2iP 10 <sup>-7</sup> M	1,580	»	+2iP 10 <sup>-7</sup> M 1,600
»	+2iP 10 <sup>-6</sup> M	1,900	»	+2iP 10 <sup>-6</sup> M 1,950
Geraniolo 5 mg%		0,871	Farnesolo 5 mg%	0,795
»	+2iP 10 <sup>-7</sup> M	1,445	»	+2iP 10 <sup>-7</sup> M 1,570
»	+2iP 10 <sup>-6</sup> M	1,850	»	+2iP 10 <sup>-6</sup> M 1,900
Geraniolo 10 mg%		0,736	Farnesolo 10 mg%	0,520
»	+2iP 10 <sup>-7</sup> M	1,350	»	+2iP 10 <sup>-7</sup> M 1,330
»	+2iP 10 <sup>-6</sup> M	1,800	»	+2iP 10 <sup>-6</sup> M 1,730
Geraniolo 2 mg%			Farnesolo 2 mg%	
+ Adenina 10 <sup>-6</sup> M			+ Adenina 10 <sup>-6</sup> M	0,990
Geraniolo 5 mg%			Farnesolo 5 mg%	
+ Adenina 10 <sup>-6</sup> M			+ Adenina 10 <sup>-6</sup> M	0,810
		Controllo:	1,140 + 0,010	
		2iP 10 <sup>-7</sup> M:	1,145 + 0,015	
		2iP 10 <sup>-6</sup> M:	1,135 + 0,010	

*Lieviti*: la tavola N° 5 riporta in per cento rispetto al controllo lo sviluppo di 18 specie di lieviti come influenzato da concentrazione 10<sup>-7</sup> M delle diverse citochinine sintetiche e naturali ed inoltre dell'adenina. Il substrato impiegato era quello di Wickerham con asparagina come sorgente di azoto. Le colture sono state incubate a 28°C e lo sviluppo controllato in piena fase logaritmica contando le cellule con camera Petroff-Houser. Questi risultati, molto vari ed in qualche caso vistosi, come per qualche specie a metabolismo misto (cioè fermentativo ed ossidativo, ma preferenzialmente ossidativo), si riferiscono a colture arieggiate. Nel caso

Tav. 4. — Effetto di N<sup>6</sup>-(<sup>2</sup>Δ-isopentenil) adenina 10<sup>-7</sup>M sulla replicazione del colifago T<sub>4</sub> (da Coppola e Marino, lavoro in via di completamento).

Modalità della aggiunta di 2iP alla coltura di <i>E. coli</i> rispetto alla infezione fagica	Numero medio aree litiche per piastra (*)	Incrementi replicazione fagica (%)
5 min. prima dell'infezione	2.568	280,34
al momento dell'infezione	1.823	199,02
5 min. dopo l'infezione	1.439	157,09
10 min. dopo l'infezione	914	99,77
Controllo (senza 2iP)	916	100,00

(\*) Su piastre di agar-germi (*E. coli*) inoculate con dil. 10<sup>-8</sup> della coltura infettata, dopo 120 min. dalla infezione fagica.

Tav. 5. — Incrementi percentuali dello sviluppo di lieviti in presenza di citochinine e di adenina (conc. 10<sup>-7</sup>M). Controllo = 100.

Specie	Ade	Chine- tin	6-BAde	2iP	IPA	Zeatina	Z.-ri- boside
<i>Candida stellatoidea</i>	84	136	130	260	185	123	120
<i>Candida utilis</i>	130	192	200	292	176	284	155
<i>Metsch. pulcherrhina</i>	90	232	232	580	295	225	188
<i>Debary. guilliermondii</i>	80	160	180	180	130	160	145
<i>Schizosacc. octosporus</i>	97	100	102	100	100	100	99
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	107	107	86	100	101	84	90
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	96	105	95	164	110	108	100
<i>Sacch. cerevisiae ellips.</i>	100	118	99	87	89	86	93
<i>Hanseniaspora viniae</i>	101	121	125	124	125	121	117
<i>Hansenula anomala</i>	100	136	134	277	185	131	122
<i>Hanseniasp. guillierm.</i>	97	126	120	142	115	123	111
<i>Torulopsis corallina</i>	97	102	102	100	102	100	101
<i>Torulopsis famata</i>	103	116	157	169	103	102	100
<i>Lypomyces starkeyi</i>	98	101	108	110	105	101	102
<i>Cryptococcus laurentii</i>	100	100	100	100	96	98	98
<i>Kloeckera apiculata</i>	95	150	160	170	103	110	105
<i>Schizosacch. pombe</i>	106	127	131	131	129	118	123
<i>Endomycopsis sp.</i>	115	153	250	265	220	115	120

invece di colture con sola agitazione magnetica, l'effetto della citochinina è sensibilmente meno marcato. Caratteristica del responso dei lieviti rispetto agli schizomiceti è quella per cui l'influenza delle citochinine si ripercuote sulla produzione della biomassa della coltura, estendendosi fino alla fase di crescita stazionaria. Lo studio dell'effetto delle citochinine sul metabolismo dei lieviti si prospetta quindi molto interessante.

*Aspergillus niger*: questa specie si è mostrata sensibile alle citochinine, confermando, nei nostri esperimenti, i risultati ottenuti da SUPNIEWSKI e coll. (l. c.) con la chinetina. Nella tavola N° 6 sono riportati gli incrementi percentuali della sua crescita in presenza delle diverse sostanze aggiunte al substrato colturale (liquido di Czapek con glucosio

Tav. 6. — Incrementi percentuali della crescita di *Aspergillus niger* in presenza di adenina e di diverse citochinine. Controllo = 100.

Sostanze saggiate	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
	Concentrazioni (M)				
Adenina	77	84	89	96	98
Chinetina	92	126	113	103	99
N <sup>6</sup> -Benziladenina	95	137	145	105	102
2iP	101	108	110	100	100
IPA	98	103	96	96	98
Zeatina	98	101	137	157	112
Zeatin-Riboside	106	155	122	118	106

come sorgente di carbonio), ricavati gravimetricamente dopo 13 giorni di incubazione a 28°C. Interessanti sono apparsi anche i risultati ottenuti ripetendo gli esperimenti in presenza di 2γ/l di acido β-indolacetico: il responso sulla crescita ha subito lievi modifiche rispetto a quello ottenuto in assenza di auxina, tranne nel caso dell'adenina che è apparsa non più inibire lo sviluppo ma stimolarlo leggermente; ma decisamente marcato si è mostrato l'effetto delle citochinine sulla produzione di conidi. Le differenze, molto evidenti, fra le diverse condizioni sperimentali, sono state rilevate apprezzando la superficie del micelio galleggiante sul liquido colturale ricoperta dalle fruttificazioni, ed espresse in incrementi percentuali riportati nella tavola N° 7.

Presumibilmente, organismi ancora più evoluti di *Aspergillus niger* potrebbero prestarsi per evidenziare influenze ancora più significative delle

Tav. 7. — Incrementi percentuali della produzione di conidi da *Aspergillus niger* in presenza di adenina e di diverse citochinine + 2γ/1 di acido β-indolacetico. Controllo = 100.

Sostanze saggiate	Concentrazione (M)				
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
Adenina	80	100	100	100	100
Chinetina	60	70	260	110	100
N <sup>6</sup> -Benziladenina	70	100	120	100	100
2iP	60	100	120	100	100
IPA	90	120	120	100	100
Zeatina	80	90	280	120	120
Zetatin-Riboside	90	90	200	180	100

citochinine sui molteplici fenomeni concernenti il metabolismo ed il differenziamento. Questo, naturalmente, esula dai nostri programmi sperimentali, che hanno riguardato e riguarderanno soltanto microrganismi di nostro interesse.

#### RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano il Dr. Dieter Klämbt, il Dr. Lloyd Y. Quinn ed il Prof. Dieter Söll, per aver fornito sostanze o ceppi microbici come indicato nel testo. Ringraziamenti sono rivolti anche al Dr. Salvatore Germano ed al Dr. Italo Capriglione, per la loro collaborazione. Il Dr. Italo Capriglione, Assistente volontario e Borsista presso l'Istituto di Microbiologia Agraria dell'Università di Napoli, ha eseguito le indagini relative allo studio dell'effetto delle citochinine su *Nitrosomonas europaea*.

#### RIASSUNTO

Indagando sul ruolo delle citochinine nella fisiologia della cellula microbica, l'effetto di citochinine sintetiche (chinetina e N<sup>6</sup>-benziladenina) e naturali (N<sup>6</sup>-(Δ<sup>2</sup>-isopentenil) adenina, zeatina e rispettivi ribosidi) è stato saggiato sullo sviluppo di 8 schizomiceti e di 18 lieviti; inoltre sulla crescita e sulla produzione di conidi da parte di *Aspergillus niger*.

#### SUMMARY

Studying about the cytokinins role in microbial physiology, the effect of synthetic (kinetin and N<sup>6</sup>-benzyladenine) and natural (N<sup>6</sup>-(Δ<sup>2</sup>-isopentenyl) adenine, zeatin and their ribosides) cytokinins has been assayed on the growth of 8 schizomycetes and 18 yeast. Their influence on growth and conidia production by *Aspergillus niger* has also been assayed.

BIBLIOGRAFIA

- BARTZ J.K., L.K. KLINE e D. SÖLL (1970) —  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil)-adenina: biosynthesis in vitro in tRNA by an enzyme purified from *Escherichia coli*. Bioch. Bioph. Res. Comm., 40, 1481.
- BERRIDGE M.V. e R.K. RALPH (1970) — The binding of kinetin to plant ribosomes. Biochem. J., 119, 75.
- BIEMANN K., S. TSUNAKAWA, J. SONNENBICHLER, H. FEYDMANN, D. DÜTTING e H.G. ZACHAU (1966) - Struktur eines ungewöhnlichen Nucleosids aus serin-spezifischer tRNA. Angew. Chem., 78, 600.
- BLONDEAU R. (1970) — Production d'une substance de type cytokinine par des *Arthro-bacter d'origine rhizosphérique*. C.R. Aca. Sc. Paris, 270, 3158.
- BURROWS W.J., D.J. ARMSTRONG, F. SKOOG, S.M. HECHT, J.T.A. BOYLE, N.J. LEONARD e J. OCCOLOWITZ (1969) — The isolation and identification of two cytokinins from *Escherichia coli* tRNA. Biochem., 8, 4071.
- COPPOLA S. e M. GIANNATTASIO (1968 a) — Attività citochinica in un actinomicete rizosferico. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., XLIV, 22, 1913.
- COPPOLA S. e M. GIANNATTASIO (1968 b) — Attività citochinica in frazioni dell'acido ribonucleico isolato dal *Rhizobium leguminosarum* Frank. Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Napoli, IV, 3.
- COPPOLA S., G. TUCCI e G. PICCI (1971) — Growth-rate and cytokinin contents in *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. Giornale di Microbiol., in corso di stampa.
- DORSEY J.K. e J.W. PORTER (1968) — The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farsenyl pyrophosphates. J. Biol. Chem., 243, 4667.
- FITTLER F., L.K. KLINE e R.H. HALL (1968) —  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)-adenosine: biosynthesis in vitro by an enzyme extract from yeast and rat liver. Bioch. Bioph. Res. Comm., 31, 571.
- FORMISANO M. (1956) — Guida allo studio tecnico della microbiologia agraria ed industriale. Edagricole, Bologna, p. 145.
- GEFTER M.L. e R.L. RUSSELL (1969) — Role of modifications in tyrosine transfer RNA: a modified base affecting ribosome binding. J. Mol. Biol., 39, 145.
- HALL R.H. (1971) — The modified nucleosides in nucleic acids. Columbia Univ. Press, New York.
- HAYY R.H., M.J. ROBINS, L. STASIUK e R. THEDFORD (1966) — Isolation of  $N^6$ -( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethylallyl) adenosine from soluble ribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc., 88, 2614.
- HASHIMOTO S., M. MIYAZKI e S. TAKEMURA (1969) — Nucleotide sequence of tyrosine transfer RNA from *Torulopsis utilis*. J. Biochem., 65, 659.
- HAYASHI H., H. FISCHER e D. SÖLL (1969) — Transfer Ribonucleic acid from *Mycoplasma*. Biochem., 8, 3680.
- JOHNSON T.B., C. ROSS e R. BAKER (1970) — Similarity of cytokinin contents and electrophoretic banding patterns of tomato crown gall tumor and stem RNA's. Bioch. Bioph. Acta, 199, 521.
- KENDE H. e J.E. TAVERES (1968) — On the significance of cytokinin incorporation into RNA. Plant Physiol., 43, 1244.
- KENNEL D. (1960) — The effects of indolacetic acid and kinetin on the growth of some microorganisms. Exptl. Cell Res., 21, 19.

- KLÄMBT D. (1967) — *Nachweis eines cytokinins aus Agrobacterium tumefaciens und sein vergleich mit dem cytokinin aus Corynebacterium fascians*. *Wissenschaft. Zeitschrift der Univ. Rostok*, 4-5, 623.
- KLÄMBT D., THIES e F. SKOOG (1966) — *Isolation of cytokinins from Corynebacterium fascians*. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.*, 56, 52.
- KLINE L.K., F. FLITTER e R.H. HALL (1969) — *N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)-adenosine. Biosynthesis in tRNA in vitro*. *Biochem.*, 8, 4661.
- LITWACK M.D. e A. PETERKOFKY (1971) — *Transfer Ribonucleic acid deficient in N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl) adenosine due to mevalonic acid limitation*. *Biochem.*, 10, 994.
- MARUZZELLA J.C. e J.G. GARNER (1963) — *Effect of kinetin on Bacteria*. *Nature*, 200, 385.
- MATHYSSE A.G. e M. ABRAMS (1970) — *A factor mediating interaction of kinins with the genetic material*. *Bioch. Bioph. Acta*, 199, 511.
- MILLER C.O. (1967) — *Zeatin and zeatin-riboside from a mycorrhizal fungus*. *Science*, 157, 1055.
- PETERKOFKY A. (1968) — *The incorporation of mevalonic acid into the N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosine of tRNA in Lactobacillus acidophilus*. *Biochem.*, 6, 472.
- QUINN L.Y., R.P. OATS e T. SNEED BEERS (1963) — *Support of cellulose digestion by Clostridium thermocellum in a kinetin-supplemented basal medium*. *J. Bacteriol.*, 86, 1359.
- RAZIN S., H.J. MOROWITZ e T.M. TERRY (1965) — *Membrane subunits of Mycoplasma laidlawii and their assembly to membranelike structures*. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.*, 54, 219.
- ROMANOW I., P. KAISER e J. POCHON (1969) — *Action des cytokinines synthétiques sur la croissance et la formation de pigments par Rhodospirillum rubrum*. *Ann. Ist. Pasteur*, 117, 243.
- ROUSSAUX J. e R. HEIM (1971) — *Influence de l'actinomycine D et du cloramphénicol sur la croissance de bourgeon de pois stimulés par la 6-benzylaminopurine*. *C.R. Aca. Sc. Paris*, 272, 3271.
- SHAW G., B.M. SMALLWOOD e F.C. STEWARD (1968) — *Synthesis and cytokinin activity of the 3-, 7- and 9-Methyl derivatives of zeatin*. *Experientia*, 24, 1089.
- SIPERSTEIN M.D. e V.M. FAGAN (1966) — *Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol*. *J. Biol. Chem.*, 241, 602.
- SKOOG F. e D.J. ARMSTRONG (1970) — *Cytokinins*. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, 339.
- SKOOG F., D.J. ARMSTRONG, J.D. CHERAYIL, A.E. HAMPPEL e R.M. BOCK (1966) — *Cytokinin activity: localization in tRNA preparations*. *Science*, 154, 1354.
- SKOOG F. e N.J. LEONARD, in LETHAM D.S. (1968) — *Biochemistry and physiology of plant growth substance*. Whitman, F., Setterfield, G. Eds., Runge, Ottawa, 1642.
- SMITH P.F. e M.R. SMITH (1970) — *Cholesterol inhibition of isopentenyl pyrophosphate  $\Delta^3$ ,  $\Delta^2$ -isomerase in Mycoplasma laidlawii*. *J. of Bacteriol.*, 103, 27.
- SUPNIEWSKI J., J. KRUPINSKA e B. WACLAW (1957) — *The biological properties of kinetin and thiokinetin*. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, V, 19.

P. NANNIPIERI - S. CERVELLI - R. ARINGHIERI - P. SEQUI

INFLUENZA DEL 2, 4, 5-TP SULL'ASSORBIMENTO DI VARIE  
FORME AZOTATE DA PARTE DI PIANTINE DI FRUMENTO  
IN CULTURA IDROPONICA

È ben noto che le piante sono in grado di selezionare i micro-organismi presenti nella rizosfera (13, 14) e che questi possono a loro volta influenzare sia lo sviluppo radicale (2, 9), sia la composizione della linfa radicale (7, 8), sia l'assorbimento dei cationi e degli anioni (1, 3, 16, 17, 18), sia lo sviluppo fisiologico e la resa delle colture (4, 11, 12).

Se si eccettuano i casi di alcuni micro-organismi, come gli azoto fissatori o i nitrificanti, poco tuttavia si conosce sulla possibilità da parte della microflora di influenzare direttamente l'assorbimento degli elementi nutritivi da parte delle piante. Si può ipotizzare che i micro-organismi della rizosfera siano capaci di rendere più assimilabili alcuni elementi nutritivi con diversi meccanismi, come con la trasformazione degli ioni metallici di forme chelate specifiche disponibili per le radici, come liberando nella soluzione circolante sostanze che favoriscano l'assorbimento radicale, o come, per esempio, modificando nel *microhabitat* della rizosfera la composizione della soluzione circolante con la prevalenza di ioni che favoriscano il passaggio di membrana.

Quando nella rizosfera interviene un fattore esterno in grado di operare una selezione della microflora, come nel caso dell'aggiunta al terreno di un erbicida, è lecito aspettarsi che vengano modificati anche i rapporti tra pianta e micro-organismi.

In questa nota vengono riportati i risultati di un'esperienza diretta ad accertare l'influenza del 2, 4, 5-TP sull'assorbimento dell'azoto nitrico e ammoniacale da parte delle piante.



## MATERIALI E METODI

Le cariossidi di frumento c.v. S. Pastore fam. 14 sono state fatte germinare su quarzo in piastre di Petri, contenenti una soluzione  $10^{-4}$  M di  $\text{CaSO}_4$  a temperatura non superiore a  $20^\circ\text{C}$ . Dopo tre giorni i germogli venivano fatti sviluppare in una soluzione acquosa secondo un metodo già da noi riportato (10). Dopo 14 giorni i germogli cresciuti in condizioni di azoto carenza venivano sottoposti al lavaggio delle radici in acqua, con moderato gorgogliamento di aria e riuniti in gruppi. Ogni gruppo, composto di 24 piantine, veniva utilizzato per una singola esperienza trasferendolo in un opportuno recipiente contenente  $1/5$  della concentrazione della soluzione A-Z di Hoagland arricchita di 2 meq/l di  $\text{MgSO}_4$ , 1 meq/l di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , di 0,4 meq/l di azoto ammoniacale o nitrico e quantità variabili di 2, 4, 5-TP. La determinazione dell'azoto ammoniacale veniva eseguita col metodo di NESSLER; quella dell'azoto nitrico col metodo di JOHNSON e ULRICH (6).

Come mezzo per l'isolamento dei microrganismi della rizosfera formanti colonie, è stato usato l'estratto di terra agarizzato secondo POCHON diluito 1:1 in modo da ridurre il diametro delle colonie sviluppate.

Per il conteggio dei microrganismi, dalla soluzione idroponica, le radici venivano prelevate asepticamente, sospese in volume noto di acqua distillata sterile. La semina in piastra veniva fatta con il metodo delle diluizioni-sospensioni con riferimento finale al peso secco delle radici. L'incubazione era fatta a  $28^\circ\text{C}$  per 48 ore (\*).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 1 sono riportati i risultati delle prove di assorbimento dell'azoto ammoniacale in presenza ed in assenza di 2, 4, 5-TP. Come si può vedere, l'effetto dell'erbicida si manifesta solo dopo 48 ore. Dopo questo intervallo di tempo, mentre a concentrazioni di 10 e 20 p.p.m. esso esalta l'assorbimento ammoniacale, a concentrazioni di 30 p.p.m. si ha una diminuzione dell'assorbimento.

I risultati dell'assorbimento dell'azoto nitrico in presenza ed in as-

---

(\*) Il conteggio dei microorganismi è stato effettuato grazie alla cortese collaborazione del Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo del C.N.R. di Pisa.

Tab. 1. - Assorbimento di azoto ammoniacale in  $\mu\text{eq/l}$  di N per gruppo di piantine in assenza ed in presenza di varie quantità di 2,4,5-TP.

Ore di esperienza	6	24	48	72
Senza 2,4,5-TP	187,50	741,00	1156,93	1530,43
con 10 p.p.m. di 2,4,5-TP	187,43	749,57	1324,18	1747,82
con 20 p.p.m. di 2,4,5-TP	188,79	730,29	1371,65	1853,58
con 30 p.p.m. di 2,4,5-TP	187,69	683,26	1070,05	1083,34

senza di 2, 4, 5-TP sono riportati nella tabella 2. Da questi dati si vede che il 2, 4, 5-TP a tutte le concentrazioni studiate ha un effetto negativo sull'assorbimento dell'azoto nitrico. Si osserva però che l'effetto che si verifica alla concentrazione di 10 p.p.m. è intermedio a quelli che si verificano alle concentrazioni di 20 e 30 p.p.m. I risultati del conteggio microbico eseguito sono riportati nella tabella 3. Si può osservare una

Tab. 2. - Assorbimento di azoto nitrico in  $\mu\text{eq/l}$  di N per gruppo di piantine in assenza ed in presenza di varie quantità di 2,4,5-TP.

Ore di esperienza	6	24	48	72
Senza 2,4,5-TP	40,43	147,29	245,72	341,15
con 10 p.p.m. di 2,4,5-TP	26,64	90,78	154,92	214,78
con 20 p.p.m. di 2,4,5-TP	36,71	127,71	210,21	263,78
con 30 p.p.m. di 2,4,5-TP	21,57	74,78	112,78	153,78

certa differenza, imputabile alla differenza di pH e di composizione della soluzione nutritiva, nel contenuto microbico delle due prove testimoni in assenza di erbicida. Come si vede, il 2, 4, 5-TP alle due diverse concentrazioni modifica profondamente il numero dei microrganismi presenti sulle radici, ed è lecito aspettarsi che ne operi una certa selezione. Alla concentrazione più bassa dell'erbicida si ha un notevole aumento

Tab. 3. - Dati relativi al conteggio microbico eseguito sulle radici delle piantine di frumento al termine delle prove di assorbimento. I valori vengono espressi in milioni di microrganismi per grammo di peso secco delle radici.

Tipo di azoto	senza 2,4,5-TP	+ 10 p.p.m. 2,4,5-TP	+ 20 p.p.m. 2,4,5-TP	+ 30 p.p.m. 2,4,5-TP
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (0,4 meq/l)	4.397	15.611	1.204	693
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0,4 meq/l)	1.168	2.204	3.370	1.004

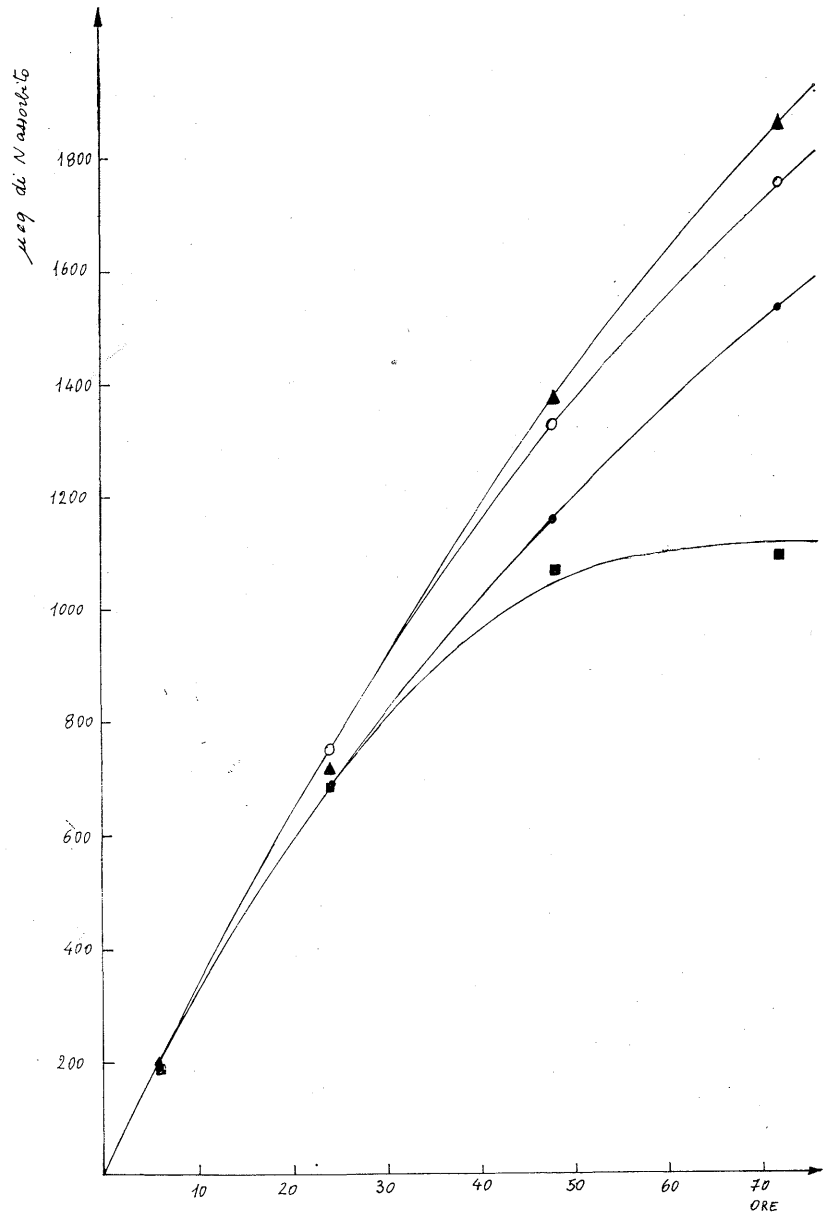


Fig. 1 - Azoto assorbito sotto forma di  $\text{NH}_4^+$  in funzione del tempo. —●—●— senza 2,4,5-TP; —○—○— con 10 p.p.m. di 2,4,5-TP; —▲—▲— con 20 p.p.m di 2,4,5-TP; —■—■— con 30 p.p.m di 2,4,5-TP.

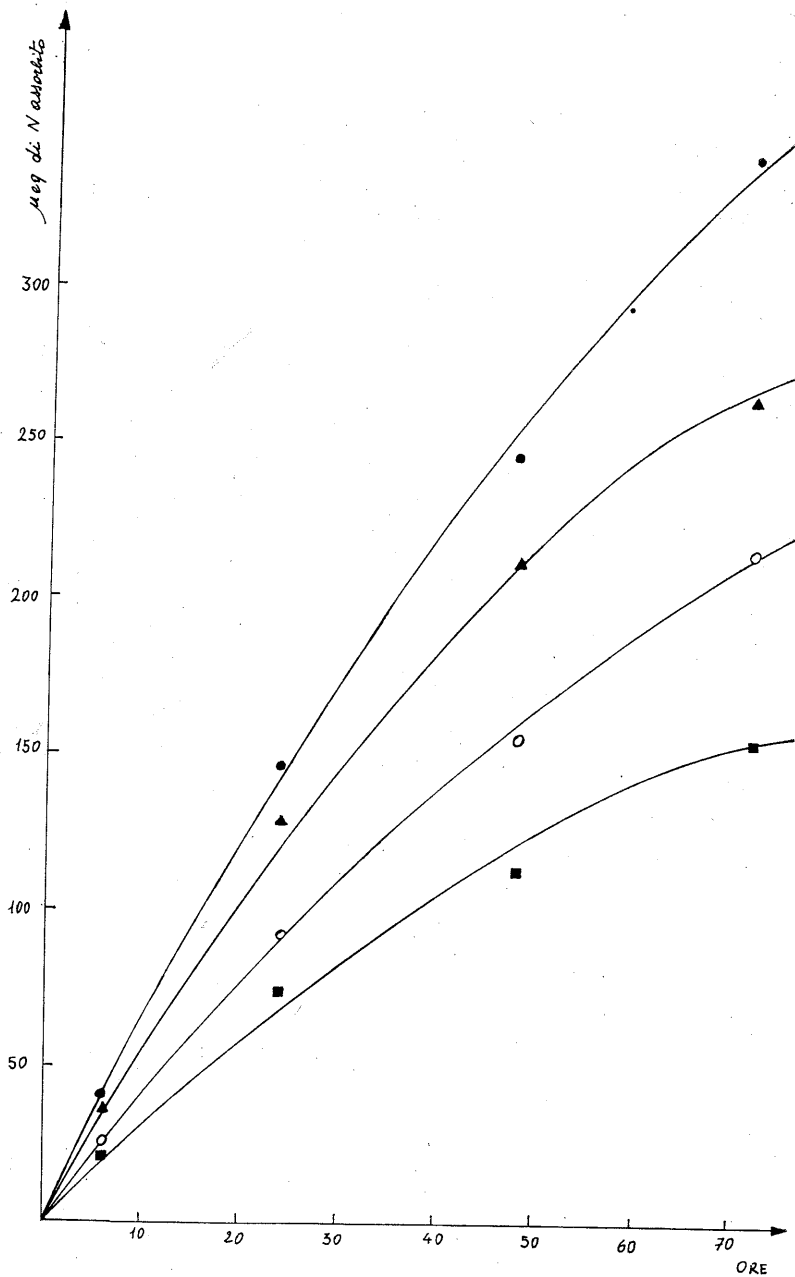


Fig. 2 - Azoto assorbito sotto forma di  $\text{NO}_3^-$  in funzione del tempo. —●—●— senza 2,4,5-TP; —○—○— con 10 p.p.m. di 2,4,5-TP; —▲—▲— con 20 p.p.m. di 2,4,5-TP; —■—■— con 30 p.p.m. di 2,4,5-TP.

della popolazione microbica con un concomitante aumento dello assorbimento dello ione  $\text{NH}_4^+$  da parte delle piantine di grano. Il fenomeno potrebbe essere imputato allo sviluppo preferenziale di una microflora che favorisce l'assorbimento degli ioni ammonio da parte delle radici. Aumentando la concentrazione a 20 p.p.m. si osserva una notevole diminuzione della popolazione ed un aumento più leggero del potere assorbente. Questo fenomeno, apparentemente contraddittorio potrebbe derivare da una ulteriore selezione operata dall'erbicida sui microrganismi della rizosfera, selezione che potrebbe ulteriormente far prevalere specie che in qualche modo favoriscono l'assorbimento. Nella esperienza con 30 p.p.m. si può notare che si ha la diminuzione di circa la metà, sia nel numero dei microrganismi presenti, sia della quantità di  $\text{NH}_4^+$  assorbito a 72 ore. I dati riportati nella tabella 3 possono risultare di più difficile interpretazione. Si può tuttavia supporre che coesistano due effetti dell'erbicida: il primo tendente a deprimere l'assorbimento dell'azoto nitrico da parte della pianta, forse per azione sulle membrane od anche per una inibizione sulla nitrato reductasi della pianta che è l'enzima responsabile della riduzione dello ione  $\text{NO}_3^-$  (5, 15); il secondo, simile a quello postulato per l'assorbimento dello ione ammonio, di selezione di una microflora che in qualche modo favorisce l'assorbimento dell'azoto da parte della pianta. Alla concentrazione di 20 p.p.m. di 2, 4, 5-TP, cui corrispondeva il massimo assorbimento di ioni ammonio da noi imputato ad un effetto rizosfera, si può notare infatti una inversione di andamento nella curva di assorbimento dello azoto nitrico.

Le prove proseguono per indagare i meccanismi di azione del composto sulle radici e per accertare il tipo di selezione verificatosi nella microflora della rizosfera.

#### RIASSUNTO

È stato investigato l'effetto del 2,4,5 - TP a varie concentrazioni sull'assorbimento di azoto nitrico ed ammoniacale da parte di piantine di frumento in soluzione idroponica. I risultati dell'assorbimento sono stati correlati con l'effetto dello erbicida sui microrganismi della rizosfera.

#### SUMMARY

The influence of 2,4,5 - TP on nitrate and ammonium uptake was studied using 14-day old nitrogen depleted wheat seedlings. The uptake has been correlated with herbicide effect on the rhizosphere microorganisms.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) BARBER D.A. - *The effect of micro-organisms on the uptake and distribution of phosphate in intact plants*. Rep. Agric. Res. Coun. radiobiol, 1965-66, 34-36 (1966).
- (2) BOWEN G.D. e A.D. ROVIRA - *Plant Soil*, 15, 166 (1961).
- (3) BOWEN G.D. e A.D. ROVIRA - *Microbial factor in short-term phosphate uptake studies with plant roots*. *Nature*, 211, 665 (1966).
- (4) BROWN M.E., S.K. BURLINGHAM e R.M. JACKSON - *Studies on Azotobacter species in soil. III. Effects of artificial inoculation on crop yields*. *Plant Soil*, 20, 194 (1964).
- (5) HAGEMAN R.H. e D. FLESHER - *Nitrate reductase activity in corn seedlings as effected by light and nitrate content of nutrient media*. *Plant Physiol.*, 35, 700 (1960).
- (6) JOHNSON C.H. e A. ULRICH - *Determination of nitrate in plant material*. *Analytical Chem.*, 22, 1526 (1950).
- (7) KRASIL'NIKOV N. - *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 128 (1961).
- (8) REMPE J.K. e O.G. KALTAGOVA - in: *Plant Microbes Relationships* (ed. J. Macura e V. Vancura), Czech. Acad. Sci. Praga, p. 128 (1965).
- (9) RENSZER H.W. - *A method for determining a carbon dioxide production of sterile and nonsterile root systems*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 14, 175 (1949).
- (10) ROTINI O.T., P. NANNIPIERI e P. SEQUI - In corso di pubblicazione su *Agrochimica*.
- (11) ROVIRA A.D. - *Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free living nitrogen fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato and wheat*. *Plant and Soil*, 19, 304 (1963).
- (12) ROVIRA A.D. - in: *Plant Microbes Relationships* (J. Macura and V. Vancura eds.), Czech. Acad. Sci. Praga, p. 193 (1965).
- (13) ROVIRA A.D. - *Interactions between plants roots and soil microorganisms*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 19, 241 (1965).
- (14) ROVIRA A.D. and M. McDUGALL - in: *Soil Biochemistry* (A.D. McLaren and G.H. Peterson eds.), p. 417 (1967).
- (15) SCHRADER L.E., G.L. RITENOUR, G.L. ELRICH and R.H. HAGEMAN - *Some characteristics of Nitrate Reductase from higher plants*. *Plant Physiol.*, 43, 930 (1968).
- (16) SUBBA-RAO N.S., R.G.S. BIDWELL and D.L. BAILEY - *The effect of rhizoplane fungi on the uptake and metabolism of nutrients by tomato plants*. *Canad. J. Bot.*, 39, 1759 (1962).
- (17) TROLLDEINER G. and U. MARCKWODRT - *Investigations on the effect of soil microorganisms on the rubidium and calcium uptake of plants grown in nutrient solution*. *Arch. Mikrobiol.*, 43, 148 (1962).
- (18) WELTE E. and G. TROLLDEINER - *Effects of soil microorganisms on the dry matter production and ash content of plants grown in nutrient solution*. *Arch. Mikrobiol.*, 43, 138 (1962).

## DISCUSSIONE

Dr. PACIONI

La prima domanda vorrei rivolgerla alla Dr.ssa RICCI, che nella sua esposizione ha riferito su una sostanza attivatrice della crescita di *Escherichia coli*. A me interesserebbe sapere in quale terreno è stata fatta l'aggiunta e se è stata condotta qualche esperienza con il terreno selettivo che differenzia i batteri enterici (MACCONKEY).

Al Prof. LEPIDI, poi, vorrei domandare se l'accumulo di poli-beta-idrossibutirrato nell'*Azotobacter chroococcum* è un fatto normale, oppure se è dovuto ad una mutazione, perché l'accumulo di questa sostanza potrebbe essere determinato da una insufficiente attività dell'enzima condensante nella prima fase del ciclo di KREBS. Cosicché, si avrebbe dell'acetil-coenzima non più utilizzabile per questa via, che sarebbe disponibile per una condensazione ad aceto-acetil-coenzima e riduzione poi ad acido beta-idrossibutirrico, come avviene nella prima fase della fermentazione butirrica. Grazie.

Prof. CARILLI

Vorrei dire che ho trovato di estremo interesse le relazioni di questa mattina (e anche quelle di ieri, per la verità). Poi vorrei anche io chiedere qualche cosa.

Per esempio, alla Dr.ssa RICCI vorrei chiedere qualche chiarimento sulla questione dei fattori di crescita: dico fattori di crescita, perché non so se sia stata individuata la sostanza che si evidenzia mediante la crescita differenziata dei microrganismi saggiati. Se si trattasse, per esempio, di Vitamina B<sub>12</sub> o di sostanze B<sub>12</sub> simili, i risultati riferiti potrebbero avere anche un'altro interesse. È noto, infatti, che nel caso di Streptomyceti la produzione di B<sub>12</sub> avviene senza che sia necessario aggiungere al terreno culturale uno specifico precursore — il benzimidazolo — perché questi microrganismi sono capaci di sintetizzarlo. Nel caso, invece,

di alcuni batteri — ad esempio, *Propionibacterium shermanii* — è necessaria l'aggiunta del precursore, altrimenti le colture producono sostanze B<sub>12</sub> simili e non la vera Vitamina. Ora, la presenza di questa o quelle sostanze, ad esempio nei mangini, è difficile da evidenziare perché tutte sono biologicamente attive come fattori di crescita. Dunque, se ho ben inteso, la Dr.ssa RICCI ci ha riferito su una differenziazione trovata nella crescita di due diversi microrganismi test — *E. coli* ed *Euglena* — in presenza di questi fattori di crescita, con una maggiore crescita dell'*Euglena* secondo un fattore 30. Se una tale differenza fosse in relazione ad esempio con una differenziazione tra B<sub>12</sub>-like-substances e vera Vitamina, sarebbe quindi possibile stabilire la natura delle sostanze presenti nel campione in esame con soli mezzi biologici, cioè a seconda del microrganismo impiegato nel saggio.

Ci sarebbero tante altre cose da dire, ma penso che il tempo non lo permetta. Consentitemi, tuttavia, di cogliere questa opportunità per fare soltanto una considerazione di carattere generale. Nella ricerca scientifica italiana — ma certo non soltanto in questa — ed in particolare nel tipo di ricerche su cui si riferisce in questo Convegno, manca quasi del tutto l'approccio interdisciplinare, che — almeno nella maggior parte dei casi qui riferiti — potrebbe renderle di interesse più vasto. Ciò sembra certamente dovuto — non soltanto alla mia opinione — alle peculiari caratteristiche di autonomia e individualismo della nostra ricerca accademica, ma anche al fatto che (si deve avere il coraggio di dirlo) ricerche di tipo integrato sono difficili per se stesse, e richiedono in genere strutture organizzative adatte. In particolare, per quanto riguarda le difficoltà ritengo sufficiente citarne solo alcune (il problema — essenziale — di comunicazione tra ricercatori di discipline diverse; il fatto che molti ricercatori nelle discipline biologiche hanno, o hanno avuto, relativamente poco interesse in studi orientati verso la soluzione di problemi operativi, oppure hanno mancato di realizzare o riconoscere le proprie limitazioni riguardo allo sviluppo di certi tipi di informazione e di analisi, di importanza critica e fondamentale per la formazione di una razionale politica gestionale della ricerca integrata).

Queste sono cose che sanno tutti, e Vi prego quindi di scusarmi se ho voluto sottolinearle in questa sede; ma mi è sembrato opportuno farlo perché ritengo che proprio ricerche del tipo di quelle qui riferite si prestano forse meglio di altre — e con un grado di difficoltà anche minore — all'approccio interdisciplinare, come del resto testimoniano i casi in cui è stato possibile programmarle e condurle secondo tale impostazione. Grazie.



Prof. TRECCANI

Desidero chiedere al Prof. COPPOLA se non conveniva valutare la produzione microbica di citochinine in terreni colturali costituiti da estratti di terra per porsi nelle condizioni più vicine a quelle della rizosfera.

Prof. CARILLI

A proposito dell'aggiunta di citochinine, per quanto riguarda i funghi, si è parlato di *Aspergillus niger*. Poiché ci sono interessanti produzioni endogene da parte di alcuni altri Aspergilli (per esempio l'asparaginasi, enzima che recentemente ha destato notevole interesse per un impiego eventuale nella cura della leucemia), sarebbe utile sapere se l'aggiunta di queste sostanze — che a me sembrano di tipo auxinico — favorisce soltanto la crescita ponderale del fungo senza influenzare in alcun modo il contenuto del micelio. Questo perché nella mia esperienza — e, in particolare, nel caso dell'*Aspergillus terreus*, produttore di asparaginasi succede che quando la coltura sommersa è più rigogliosa il contenuto del micelio in asparaginasi è molto basso. Nel caso quindi che l'aggiunta di una sostanza di questo tipo favorisse la crescita ponderale del fungo senza diminuirne il contenuto di enzima, e forse anzi aumentandolo, sarebbe possibile ottenere produzioni specifiche molto maggiori di quelle attuali. Varrebbe comunque la pena di condurre adeguate sperimentazioni, anche in casi di produzioni esogene. Grazie.

Prof. LEPIDI

Ringrazio il Dr. PACIONI per la domanda. La domanda è se il poli-beta-idrossibutirrato sia un prodotto di accumulo fisiologico oppure un prodotto di accumulo in seguito a mutazione. *Azotobacter chroococcum* è notoriamente un azotofissatore e il terreno su cui noi lo teniamo è carente di azoto. Queste condizioni inducono accumulo di poli-beta-idrossibutirrato in tutti quanti i ceppi che noi abbiamo analizzato, pure con delle differenze fra ceppo e ceppo. Evidentemente il ceppo di cui abbiamo mostrato la fotografia è abbastanza ricco; però non è una rarità. Inoltre, questo comportamento non è esclusivo di *Azotobacter chroococcum* e tanti altri azotofissatori si comportano in questa stessa maniera. Ora è chiaro che a un certo punto ci può essere uno *shunt* del tipo da lei

proposto. Cioè: una scarsa attivazione del ciclo di KREBS, accumulo di acetilcoenzima A, aceto-acetato e sintesi di poli-beta-idrossibutirrato in eccesso. Ed in *Azotobacter chroococcum* questo può essere anche vero perché, in base ai dati che prima ho accennato, la sintesi parte da acetato. Però ci sono tanti altri microrganismi tra cui anche diversi *Rhodospirillum*, *Aërobacter* ecc... per i quali la letteratura dà un pathway di sintesi diverso. In ogni caso il poli-beta-idrossibutirrato è caratteristico di numerosi microrganismi azotofissatori; e sembra che sia un ottimo accorgimento di accumulo di composti ad alto contenuto energetico nelle cellule vive proprio in vista di un impiego nell'azotofissazione che notoriamente richiede una spesa di energia. Recentemente stiamo cercando di appurare proprio se una cosa del genere può verificarsi anche in altri gruppi di microrganismi, però è ancora troppo presto per qualsiasi anticipazione. Può darsi che la sua domanda faccia parte proprio del contesto su cui dovremo ragionare. Grazie.

Prof. COPPOLA

Ringrazio innanzitutto il Prof. TRECCANI ed il Prof. CARILLI per l'interesse mostrato.

Al Prof. TRECCANI faccio presente che abbiamo scartato l'impiego dell'estratto di terra per la coltura dei nostri microrganismi perché l'estratto di terra non è un substrato limpido: la centrifugazione di colture in estratto di terra avrebbe prodotto sedimenti contenenti, con le cellule, impurezze non allontanabili coi normali lavaggi. Abbiamo perciò preferito procedere alla estrazione delle citochinine da cellule il più possibile pulite, come si possono ottenere soltanto in substrati nutritivi limpidi.

Per quanto riguarda le rese in biomassa delle colture, c'è da dire che esse non sono state molto alte perché si è proceduto alla raccolta delle cellule in corrispondenza della « *early-log-phase* », di quella fase cioè in cui è noto essere più alto il contenuto in citochinine, ma nella quale, naturalmente, lo sviluppo della coltura è ancora agli inizi.

In risposta poi all'interessante domanda del Prof. CARILLI, ripeto che l'effetto delle citochinine sul metabolismo microbico, quindi sulla sintesi di enzimi e di altri metaboliti, è in corso di studio nel nostro Istituto. Sono noti intanto alcuni risultati ed applicazioni pratiche: per esempio un brevetto belga protegge l'impiego della chinetina (1 gamma per litro) nei substrati di fermentazione, per incrementare la produzione di antibiotici da *Streptomyces rimosus*.

Dr.ssa RICCI

Ringrazio il Prof. CARILLI ed il Dottor PACIONI per le loro domande. Per quanto riguarda il primo quesito del Dottor PACIONI, posso ripetere quanto precisato nella mia comunicazione. Il dosaggio della vitamina B<sub>12</sub> è stato realizzato utilizzando l'appropriato terreno di coltura (mezzo di DAVIS) disponibile sul mercato. Come è noto, nei dosaggi microbiologici si fa generalmente ricorso ai terreni di coltura appositamente preparati dalle principali case produttrici di substrati per batteriologia. Circa il secondo quesito, in queste indagini il terreno di MACCONKEY non aveva alcun motivo per essere usato.

Per quanto riguarda il quesito posto dal Prof. CARILLI, è noto che l'alga *Ochromonas malhamensis* è la più specifica nel responso delle diverse forme di B<sub>12</sub> clinicamente attive. GUTTMAN (IN: KAVANAGH (Editore) - Analytical Microbiology. Pag. 529, 1963) ha riassunto il responso degli altri microrganismi comunemente impiegati per il dosaggio della vitamina B<sub>12</sub>. *Euglena gracilis* ceppo Z è più specifico di *Escherichia coli*, poiché mentre l'alga risponde solo ad alcune cobalamine (che derivano dalla vitamina B<sub>12</sub> per sostituzione del ribotide del 5, 6-dimetilbenzimidazolo con un altro nucleotide), il batterio risponde ad un maggior numero di esse, al fattore B ed alla metionina. Questo diverso comportamento rende ragione del fatto che con *Escherichia coli* si siano ottenuti dati sempre più elevati. *Euglena gracilis* offre inoltre il vantaggio di essere più sensibile del batterio. Questa prerogativa, che è indipendente dalla specificità di responso, risulta vantaggiosa quando si opera con materiale a basso contenuto di B<sub>12</sub>.

Per quanto riguarda, infine, la possibilità di discriminare per via biologica la vitamina B<sub>12</sub> dalle sostanze B<sub>12</sub>-simili, da quanto ho fin qui detto si deduce che in qualche misura questo risultato può essere ottenuto. Mentre con *Ochromonas malhamensis* è possibile dosare la Vit. B<sub>12</sub> e poche altre cobalamine, con microrganismi dotati di minore specificità di responso, quali *E. coli*, oltre alla B<sub>12</sub> si svela la presenza di un numero variabile di altre sostanze B<sub>12</sub>-simili, eventualmente presenti.

Prof. FLORENZANO

Volevo domandare, a proposito della comunicazione relativa alla rizosfera degli agrumi, al Dr. FAVALORO come si può spiegare la maggior carica fungina da lui riscontrata sulle radici vegetanti, mentre dalla letteratura si rileva in generale che le radici non vegetanti o dormienti risultano più ricche di funghi (PARKINSON ed altri AA.).

Dr. FAVALORO

Sono d'accordo con l'osservazione fattami. Nondimeno i risultati delle nostre indagini attestano una maggior abbondanza di funghi sulle radici vegetanti, verosimilmente a causa della particolare natura degli essudati radicali degli agrumi. Però questo aspetto non è stato preso in considerazione nel nostro lavoro.

CHIUSURA DEI LAVORI DEL CONVEGNO  
DA PARTE DEL PRESIDENTE DELLA TERZA COMMISSIONE  
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO.  
PROF. GINO FLORENZANO

Vorrei adesso, nel chiudere i lavori, rivolgere un sentito ringraziamento, a nome del Presidente della SISS e a nome della Commissione Biologia, che ho l'onore di presiedere e che è presente qui al completo con i suoi membri Proff. BANFI, PICCI, TRECCANI e MATERASSI, per quello che hanno fatto nella organizzazione di questo convegno che ci ha fatto tremare le vene e i polsi al pensiero, come ho accennato ieri, che i rapporti piante-microrganismi erano stati già trattati a livelli internazionali, altamente qualificati come quelli di Praga, Parigi, Berkeley.

Dai lavori del convegno abbiamo escluso, a ragion veduta, i rapporti leguminose-rizobi, i rapporti micorrizici e le implicazioni fitopatologiche del rapporto pianta-microrganismi, altrimenti il colloquio si sarebbe enormemente dilatato a danno dell'approfondimento.

Al successo dei nostri lavori ha inoltre concorso la felice concomitanza della conferenza del Prof. McLaren, che il Laboratorio di Chimica del Terreno del CNR, rappresentato qui dal suo Direttore Prof. Sequi, ha invitato a partecipare. Ma il ringraziamento più caldo devo rivolgere, a nome della SISS, all'Università di Pisa che ci ha concesso questa prestigiosa ospitalità, al Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo del CNR di Pisa, diretto dal Prof. Verona ed al Centro per la Micologia del Terreno del CNR di Torino, diretto dal Prof. A. CERUTI. Sono certo di interpretare i sentimenti dei convegnisti nel ringraziare anche il Prof. J. POCHON che ha inviato la sua adesione ed il suo augurio di buon lavoro, come autorevole riconoscimento della nostra fatica a lui familiare per avere, fra l'altro, nel 1966, tenuto in Parigi un colloquio proprio sulle interazioni piante-microrganismi.

Un breve commento al merito dei lavori. A parte le relazioni generali, sulla cui importanza non è il caso di ritornare, dopo le discussioni cui hanno dato luogo, mi piace richiamare l'attenzione dei presenti sul contributo di grande rilievo delle comunicazioni, tutte a carattere spe-

rimentale, che hanno messo l'accento sul vivo del problema dei rapporti indiretti pianta-microrganismi, che in questo convegno possiamo dire, a posteriori, abbia compiuto progressi interessanti verso una conoscenza più esauriente.

Desidero prima di tutto compiacermi con la Prof.ssa CORBERI e la Dr.ssa SOLARO, per il fatto di essersi dedicate allo studio di un aspetto nuovo dell'equilibrio microbiologico del suolo e della rizosfera, quale è quello della predazione e del parassitismo nel terreno.

Al Prof. SEQUI ed ai suoi collaboratori voglio esprimere tutto il mio apprezzamento per il contributo allo studio del meccanismo di azione degli essudati, veramente interessante perchè rappresenta una conferma dell'importanza del rapporto carbonio-azoto degli essudati (problema affrontato in un lavoro di HARMSSEN e JAGER) e delle varie frazioni di essi. Anche il lavoro di NANNIPIERI e coll. sull'effetto dell'erbicida 2, 4, 5 TP sul metabolismo dell'azoto nella rizosfera di frumento, rappresenta veramente un approccio importante che sarebbe desiderabile approfondire con uno studio non solo della carica microbica totale in funzione dell'assorbimento selettivo dello ione ammonio rispetto a quello nitrico, ma anche nel quadro dell'attività dei gruppi fisiologici di microrganismi interessati al ciclo dell'azoto (ammonizzanti, nitrificanti e denitrificanti).

Mi rallegro con il Prof. COPPOLA e con i dottori PERCUOCO e ZOINA per gli originali contributi all'intelligenza del meccanismo di azione e di svolgimento dei fenomeni a livello rizosferico, nei quali le citochinine forse sono la chiave di volta per comprendere l'azione che i microrganismi esercitano nell'effetto rizogeno.

Il lavoro del Prof. LEPIDI e dei dottori NUTI e DE BERTOLDI merita di essere segnalato, non solo perchè in esso viene affrontato lo studio della degradazione di un polimero naturale scarsamente degradabile, ma anche per la complessità dei metodi di indagine impiegati.

Il lavoro dei dottori FAVALORO e SOMMARCO rappresenta uno spunto apprezzabile, al quale è augurabile facciano seguito ulteriori indagini, dato che sulla rizosfera degli agrumi si hanno scarsissime conoscenze.

Concludendo, ritengo necessario sottolineare che la Commissione Biologia del Suolo della nostra Società, che ha iniziato due anni orsono un dibattito sul problema della fertilità di fronte all'inquinamento, ha con il presente Colloquio realizzato un ulteriore approfondimento dei problemi biologici del suolo, perchè in fondo la fertilità del terreno si realizza prima di tutto a livello di rizosfera, nella quale si svolge e si determina il gioco veramente essenziale della produttività e del benessere della pianta.

Questo discorso biologico che abbiamo introdotto nella SISS ha avviato a maturazione il programma di una prossima manifestazione della Società, intesa proprio alla chiarificazione del problema della fertilità nei molteplici aspetti (fisico, chimico, biologico ed agronomico) e ad una sintesi generale di un argomento così complesso.

Rinnovando i più sinceri ringraziamenti non solo agli Autori delle relazioni e comunicazioni, ma anche a tutti i partecipanti che a diverso titolo hanno contribuito al successo dei nostri lavori, dichiaro, a nome della Commissione Biologia della SISS, chiusi i lavori di questo Colloquio.

## INDICE

Comitato Organizzatore . . . . .	Pag. 2
Elenco dei partecipanti . . . . .	» 3
Saluto del Presidente della Terza Commissione della Società Italiana della Scienza del Suolo, Prof. Gino Florenzano . . . . .	» 7

## RELAZIONI

O. VERONA - <i>Interrelazioni tra microrganismi e piante</i> . . . . .	Pag. 11
A.D. McLAREN - <i>Consecutive biochemical reaction in soil with particular reference to the nitrogen cycle</i> . . . . .	» 43
G. PICCI - <i>Fitotossine e microrganismi della rizosfera</i> . . . . .	» 59
G. BANFI - <i>Effetto rizosfera nel terreno ed in idroponiche</i> . . . . .	» 79
G. FLORENZANO - <i>Fondamenti bio-ecologici dell'habitat radicale e prospettive di controllo dell'effetto rizosfera</i> . . . . .	» 99
Discussione . . . . .	» 131

## COMUNICAZIONI

E. CORBERI, M.L. SOLARO - <i>Presenza di microrganismi predatori (Bdello- vibrio bacteriovorus) in diversi terreni coltivati</i> . . . . .	Pag. 137
L. TOMASELLI, R. MATERASSI - <i>Inibizione della germinazione ad opera della microflora dei semi</i> . . . . .	» 145
S. COPPOLA, G. PERCUOCO, A. ZOINA, G. PICCI - <i>Aspetti microbiologici dei disturbi da reimpianto del pesco</i> . . . . .	» 153
W. BALLONI, M.R. CELESTRE, F. FAVILLI, M.C. MARGHERI - <i>Influenza della algalizzazione sulla crescita della fragola in coltura idroponica</i> . . . . .	» 163
Discussione . . . . .	» 169
M. FAVALORO, G. SAMMARCO - <i>Ricerche sulla microflora della rizosfera degli agrumi in Sicilia</i> . . . . .	» 175
P. SEQUI, G. PETRUZZELLI, G. GUIDI, M. LA MARCA - <i>Indagini preliminari sulle proprietà delle secrezioni radicali in soluzione idroponica</i> . . . . .	» 183
S. COPPOLA, G. PERCUOCO, A. ZOINA, G. PICCI - <i>Citochinine in germi terri- coli e relativo significato nei rapporti piante-microrganismi</i> . . . . .	» 187



C. PAOLETTI, F. FAVILLI, R. MATERASSI, G. FLORENZANO - <i>Valutazione dell'azotofissazione rizosferica con il test della riduzione dell'acetilene</i>	Pag. 199
A.A. LEPIDI, M.P. NUTI, M. DE BERTOLDI - <i>Metabolismo del poli-<math>\beta</math>-idrosibutirrato nel terreno e nella rizosfera</i>	» 209
W. BALLONI, D. RICCI - <i>Produzione di vitamina B<sub>12</sub> da parte di ceppi efficaci di Rhizobium</i>	» 227
S. COPPOLA, G. PERCUOCO, A. ZOINA, G. PICCI - <i>Effetto di citochinine sintetiche e naturali sullo sviluppo microbico</i>	» 233
P. NANNIPIERI, S. CERVELLI, R. ARINGHERI, P. SEQUI - <i>Influenza del 2,4,5-TP sull'assorbimento di varie forme azotate da parte di piantine di frumento in coltura idroponica</i>	» 247
Discussione	» 255
Chiusura dei lavori del Convegno da parte del Presidente della Terza Commissione della Società Italiana della Scienza del Suolo, Prof. Gino Florenzano	» 261
Indice	» 265