

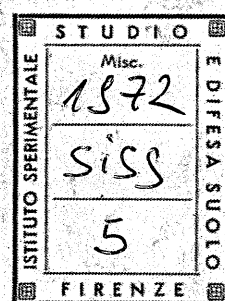
SOCIETÀ ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO

A T T I
DEL COLLOQUIO SUL TEMA
RAPPORTI PIANTE - MICRORGANISMI

EDITI CON IL CONTRIBUTO DEL CONSIGLIO NAZIONALE
DELLE RICERCHE

P I S A

9 - 10 Giugno 1972



SOCIETÀ ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO

A T T I
DEL COLLOQUIO SUL TEMA
RAPPORTI PIANTE - MICRORGANISMI

EDITI CON IL CONTRIBUTO DEL CONSIGLIO NAZIONALE
DELLE RICERCHE

ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA DIFESA DEL SUOLO	
Inventario N.	
Collocazione:	NI 42

P I S A

9-10 Giugno 1972

COMITATO ORGANIZZATORE

Prof. G.P. BALLATORE

Prof. G. BANFI

Prof. G. FLORENZANO

Prof. G. PICCI

Prof. V. TRECCANI

Prof. O. VERONA

Segretario: Prof. R. MATERASSI

ELENCO DEI PARTECIPANTI

- ANELLI Dr. Gabriele - Istituto di Industrie Agrarie, Università - Pisa
ARCARA Dr. Pier Giacomo - Istituto Sperimentale Studio e Difesa del Suolo - Firenze
ARINGHIERI Dr. Roberto - Laboratorio Chimica del Terreno del CNR - Pisa
ARMANI Prof. Giuseppe - Istituto di Microbiologia, Università - Pisa
AVANZI Prof. Enrico - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Pisa
BALLONI Prof. Valdemaro - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Firenze
BANFI Prof. Giulio - Centro Ricerche Orticole - Minoprio (Como)
BENDINELLI Prof. Mauro - Istituto di Microbiologia, Università - Pisa
BENVENUTI Prof. Antonio - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Pisa
BONARI Dr. Enrico - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Pisa
CAPARRINI Prof. Pietro - Istituto di Meccanica Agraria, Università - Catania
CARILLI Prof. Aristide - Istituto Superiore di Sanità - Roma
CARLONI Prof. Luciano - Istituto di Chimica Agraria, Università - Pisa
CAVAZZA Dr. Carlo - Via Carlo Porta, 20 - Bologna
CAVAZZA Prof. Luigi - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Bologna
CECCONI Prof. Carlo Alberto - Istituto di Chimica Agraria, Università - Firenze
CECCONI Prof. Sergio - Istituto di Chimica Agraria, Università - Firenze
CELESTRE Dr.ssa Maria Rosa - Istituto Sperimentale per la Frutticoltura - Roma
CELESTRE Prof. Pietro - Istituto di Idraulica Agraria, Università - Pisa
CERUTI Prof. Arturo - Istituto di Botanica, Università - Torino
CERVELLI Dr. Stefano - Laboratorio per la Chimica del Terreno del C.N.R. - Pisa
COPPOLA Prof. Salvatore - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Napoli

- CORBERI Prof.ssa Elisa - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Milano
- DE BERTOLDI Dr. Marco - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Pisa
- DELL'AGNOLA Dr. Giorgio - Istituto di Chimica Agraria, Università - Padova
- FASOLO BONFANTE Dr.ssa Paola - Centro di Studio per la Micologia del terreno del C.N.R. - Torino
- FAVALORO Dr. Mario - Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Palermo
- FAVILLI Prof. Franco - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Firenze
- FEDELI Prof.ssa Carlotta - Istituto di Zoocolture, Università - Pisa
- FERRARI Prof. Giovanni - Istituto di Chimica Agraria, Università - Padova
- FLORENZANO Prof. Gino - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Firenze
- FONTANA Prof.ssa Anna - Centro di Studio per la Micologia del Terreno del C.N.R. - Torino
- FORMISANO Prof. Mario - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Napoli
- FUSI Prof. Paolo - Istituto di Chimica Agraria, Università - Firenze
- GALOPPINI Prof. Carlo - Istituto di Chimica Agraria, Università - Pisa
- GAMBOGI Prof. Piero - Istituto di Patologia Vegetale, Università - Pisa
- GIORDANO Dr. Calogero - Amministrazione Provinciale - Pisa
- GUIDI Dr. Guido - Laboratorio per la Chimica del Suolo del C.N.R. - Pisa
- GROSSI Prof. Pellegrino - Istituto di Idraulica Agraria, Università - Pisa
- IZZO Dr. Riccardo - Istituto di Industrie Agrarie, Università - Pisa
- LEPIDI Prof. Aldo - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Pisa
- LEVI-MINZI Dr. Renato - Istituto di Chimica Agraria, Università - Pisa
- LORETI Prof. Filiberto - Istituto di Coltivazioni Arboree, Università - Pisa
- LOTTI Prof. Goffredo - Istituto di Industrie Agrarie, Università - Pisa
- MAGNANI Dr. Guido - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Pisa
- MALQUORI Prof. Alberto - Istituto di Chimica Agraria, Università - Firenze
- MANCINI Prof. Fiorenzo - Istituto di Geologia Applicata, Università - Firenze

- MARGHERI Dr.ssa Maria Cristina - Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del C.N.R. - Firenze
- MATARESE Dr. Matteo - Via Piave, 6 - Bologna
- MATERASSI Prof. Riccardo - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Firenze
- MCLAREN Prof. Arthur Douglas - Department of Soils and Plant Nutrition, University of California - Berkeley (U.S.A.)
- MIELE Dr. Sergio - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Pisa
- NANNIPIERI Dr. Paolo - Laboratorio per la Chimica del Terreno del C.N.R. - Pisa
- NARESE FILASTÒ Dr.ssa Marinella - Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del C.N.R. - Firenze
- NAVARI Dr.ssa Flavia - Istituto di Chimica Agraria, Università - Pisa
- NUTI Dr. Marco - Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo del C.N.R. - Pisa
- PACIONI Dr. Giovanni - Istituto Superiore di Sanità - Roma
- PALAZZOLO Prof. Vincenzo - Pro-Rettore dell'Università di Pisa
- PAOLETTI Dr. Celso - Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del C.N.R. - Firenze
- PELLISTRI Dr. Francesco - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee, Università - Pisa
- PERCUOCO Dr. Giorgio - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Napoli
- PETRUZZELLI Dr. Giannantonio - Laboratorio per la Chimica del Terreno del C.N.R. - Pisa
- PICCI Prof. Giovanni - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Napoli
- RICCI BERTOCCHI Dr.ssa Daniela - Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del C.N.R. - Firenze
- RIFFALDI Dr. Riccardo - Istituto di Chimica Agraria, Università - Pisa
- SAMMARCO Dr. Giuseppe - Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Palermo
- SCARAMUZZI Prof. Giovanni - Istituto di Patologia Vegetale, Università - Pisa
- SEQUI Prof. Paolo - Laboratorio per la Chimica del Terreno del C.N.R. - Pisa
- SOLARO Dr.ssa Maria Luisa - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Università - Milano

- SOLDATINI Dr. Gianfranco - Istituto di Chimica Agraria, Università -
Pisa
- TOMASELLI FEROCI Dr.ssa Luisa - Centro di Studio dei Microrganismi
Autotrofi del C.N.R. - Firenze
- TRECCANI DEGLI ALFIERI Prof. Vittorio - Istituto di Microbiologia Agra-
ria e Tecnica, Università - Milano
- TREGGI Prof. Giancarlo - -Istituto di Patologia Vegetale, Università - Pisa
- VERONA Prof. Onorato - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica,
Università - Pisa
- VICENTINI Dr. Gianni - Istituto di Agronomia e Coltivazioni Erbacee,
Università - Pisa
- ZOINA Dr. Astolfo - Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Univer-
sità - Napoli

SALUTO DEL PRESIDENTE DELLA TERZA COMMISSIONE
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DELLA SCIENZA DEL SUOLO
PROF. GINO FLORENZANO

Alle ore 10 del giorno 9 giugno 1972, nell'Aula Magna Storica della Università di Pisa — Palazzo della Sapienza — hanno avuto inizio i lavori del Convegno su « Rapporti piante-microrganismi » organizzato dalla terza Commissione della Società Italiana della Scienza del Suolo con la collaborazione del Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo di Pisa.

Il prof. Vincenzo Palazzolo, Rettore Magnifico della Università di Pisa, ha porto il saluto ai convenuti, ponendo in evidenza l'attualità del tema del Convegno e le sue molteplici implicazioni, che non si limitano al campo della produttività delle colture agrarie, ma investono l'ecologia delle piante e perciò la qualità dell'ambiente.

Quindi ha preso la parola il Prof. Gino Florenzano, Presidente della terza Commissione della SISS, il quale ha aperto i lavori del Convegno.

A nome del Presidente della SISS Prof. Ballatore, che non è tra noi per motivi di salute, e della Commissione Biologia del Suolo della Società, desidero rivolgere un riconoscente saluto alle Autorità di Pisa per aver voluto conferire con la loro presenza prestigio al nostro Convegno. Porgo un sentito ringraziamento alle Autorità Accademiche per aver dato ospitalità alla nostra Società in questa Aula Magna storica dell'Ateneo Pisano così suggestiva, perché è simbolo e sintesi delle più alte tradizioni dello spirito.

Con questi sentimenti che, sono certo, interpretano quelli dei Soci della SISS qui convenuti, desidero illustrare brevemente il contenuto del presente Colloquio, organizzato dalla III Commissione, sui rapporti piante-microrganismi, soprattutto per indicarne alcune limitazioni.

Il tema è di grande interesse perchè la pianta stabilisce relazioni ecologiche con i microrganismi del terreno dal punto di vista fisiologico e biochimico, così importanti per comprendere il processo produttivo delle piante, da potersi paragonare a quelle del processo « etereo » di fotosintesi. Il Colloquio si rivolge perciò essenzialmente all'esame delle relazioni, per così dire « fisiologiche », tra piante e microrganismi ed

esclude quindi le relazioni patologiche, che, se non sono meno importanti, sono tuttavia meno generali.

Una seconda limitazione concerne l'esclusione dal tema del Convegno dei rapporti simbiotici che le piante stabiliscono con batteri e funghi.

Pur così circoscritto, il tema rimane ugualmente vasto ed ambizioso, specie se si considera l'ampio dibattito in sede internazionale, cui esso ha dato luogo. Basti citare i simposi di Praga, Berkeley e Parigi, rispet-



Il Prof. Florenzano, Presidente della terza Commissione della SISS, inaugura il Colloquio. Al tavolo della Presidenza siedono, da destra a sinistra, il Prof. Palazzolo, Rettore Magnifico dell'Università di Pisa, il Prof. Verona ed il Prof. Treccani degli Alfieri.

tivamente degli anni 1963, 65 e 66, per farsi un'idea dell'arduo confronto al quale questo contributo italiano è esposto.

Nonostante queste difficoltà obiettive, il Convegno ha riscosso le più autorevoli adesioni e contributi suscitando un interesse nuovo intorno a problemi, che, bisogna riconoscere, non hanno avuto nel nostro Paese la necessaria rispondenza.

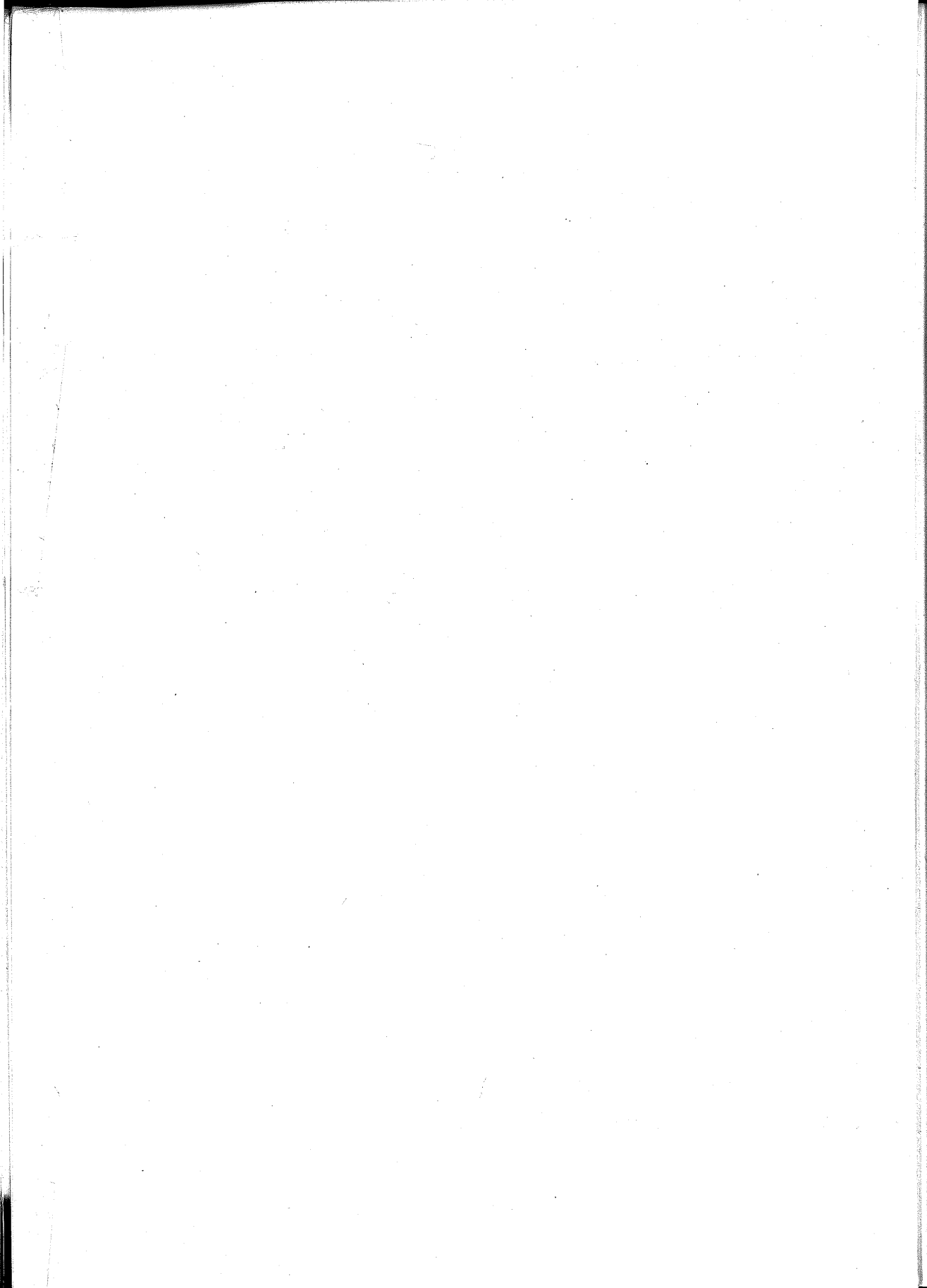
Viene oggi ripreso un discorso aperto a Firenze dalla SISS sulla struttura, le basi biologiche della fertilità del suolo ed i problemi dell'inquinamento, che dovrà concludersi con un dibattito programmato dalla

SISS sul concetto di fertilità del suolo dal punto di vista fisico, chimico, biologico ed agronomico.

Il Convegno odierno rappresenta perciò una fase interlocutoria e cruciale di un tale dibattito.

Prima di chiudere questo indirizzo, sento il dovere di rivolgere al Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo del C.N.R., al Suo Direttore Prof. Verona ed ai Suoi Collaboratori un vivo ringraziamento per avere attivamente collaborato con la Commissione Biologia del Suolo della SISS nella organizzazione del presente Colloquio.

Un ringraziamento infine devo rivolgere al Laboratorio per la Chimica del Suolo del C.N.R. per averci dato la possibilità di ascoltare, nel corso dei nostri lavori, la conferenza del prof. Douglas McLaren della Berkeley University ed a Lui a nome della SISS rivolgiamo un caloroso saluto di benvenuto.



CENTRO DI STUDIO PER LA MICROBIOLOGIA DEL SUOLO DEL C.N.R.
ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
DELL'UNIVERSITA' DI PISA

ONORATO VERONA

INTERRELAZIONI TRA MICRORGANISMI E PIANTA

Nell'iniziare la stesura del presente breve Rapporto mi sono sovvenute le parole di Pasteur: « Gaz, fluide, électricité, magnetisme, ozone, choses connues ou choses occultes, il n'y a quoi que ce soit dans l'air, hormis les germes qu'il charrie, qui soit condition de la vie ».

Poi, mi sono ritornate alla mente le varie proposizioni che, sia pure diverse nella forma, tutte concordano nell'indicare il terreno non come un inerte sfaticcio di roccia, ma come qualcosa che vive, in quanto viventi sono i numerosissimi esseri microscopici che si annidano nel suo scheletro.

Queste due nozioni muovono il tema che mi è stato proposto: « Quali interazioni si stabiliscono tra la pianta e i così tanti microrganismi che popolano il suo naturale ambiente di vita? ».

Io penso che le risposte che si potranno dare a questa domanda, nonché le conseguenze che dalle stesse risposte discendono, abbiano senso qualora si sia a conoscenza di come si comporta la pianta quando essa si trovi a vivere in ambiente axenico, cioè fuori da ogni contatto con il mondo microbico che la circonda e con il quale mondo entra in più o meno intima comunione.

La possibilità che la pianta possa vivere, se fornita di adatto alimento, in ambiente axenico, possibilità evidenziata per la prima volta da Duclaux nel 1855, è ormai nozione comune. Ma la gnotobiologia ci informa che la pianta, così cresciuta, assume un abito morfologico forse istologico, certo biochimico, più o meno diverso dalla pianta cresciuta in condizioni naturali.

C'è di più, se una pianta cresce in condizioni non amicrobiche, ma in presenza di determinati microrganismi, singoli od associati, si vede che essa si modifica ancora (e non importa se poco o molto) rispetto ad

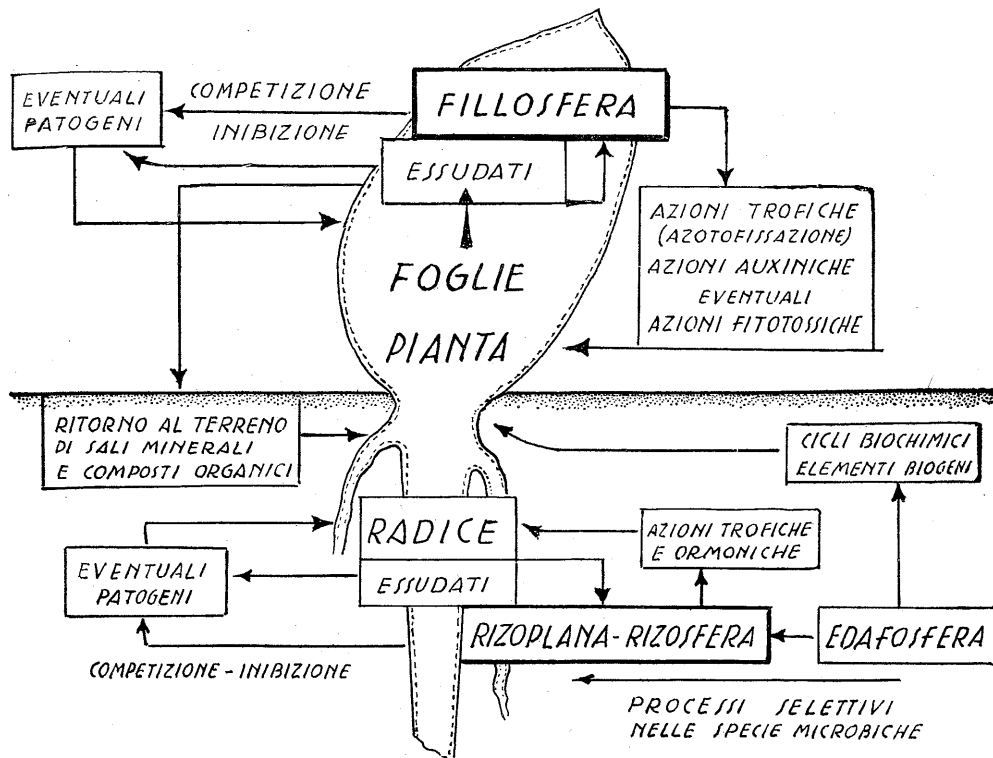


Il Prof. Verona mentre tiene la relazione generale.

uguale pianta cresciuta sia in condizioni axeniche, sia in condizioni normali. Mi risparmio, per economia di tempo, di dare la relativa documentazione (1).

Ma l'azione è reciproca poiché ben sappiamo come sotto l'influenza di piante diverse, diverso per le modificazioni che la pianta porta all'ambiente, può essere lo sviluppo, in confronto di quello che si ha nelle condizioni ritenute ottimali, dei microrganismi che le accompagnano.

(1) Per qualche notizia e qualche riferimento bibliografico vedi:
VERONA O. (1969) — *Alcuni problemi della microbiologia del terreno*. Ann. Acc. Agr. di Torino, Vol. III.



I complessi rapporti tra pianta e microrganismi.

Posto così il problema, la relativa discussione impone peraltro dei limiti, date le tante e le tanto vaste implicazioni che esso comporta e altro non consente che sommarizzarne alcuni aspetti. È pena, ad esempio, non poter discorrere intorno ai rapporti così detti di « intimità » che intercorrono tra piante e microrganismi sul piano filogenetico e biochimico; ma il discorso in questa direzione ci condurrebbe troppo lontano anche se, dal punto di vista generale, esso appare fortemente seducente portandosi addirittura a livello di DNA (2). Anche se il trasferimento

(2) Vedi per esempio:

- LEDoux L. e altri (1969) — *Fate of exogenous bacterial DNA in barley seedlings*. J. Mol. Biol., vol. 43, p. 243.
LEDoux L. e altri (1969) — *Integration and replication of DNA of M. lysodeikticus in DNA of germinating barley*. Nature, vol. 218, p. 1256.
STROUN M. e altri (1970) — *Natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells*. Nature, vol. 227, p. 607.
STROUN M. e altri (1970) — *The natural release of nucleic acids from bacteria*

del DNA microbico e la sua integrazione con quello della pianta è stato studiato, al momento, per poche specie e in particolare per *Agrobacterium tumefaciens* che è specie patogena, appare chiaro il grande interesse che assumono tal sorta di interazioni. È altresì pena, scendendo al particolare, che si debbano escludere quelle interazioni, così interessanti nella dottrina quanto importanti nella pratica, che, sia pure occasionalmente, si stabiliscono tra pianta e microrganismi fitopatogeni.

Fissati questi limiti, l'esame delle relazioni che si stabiliscono tra pianta e microrganismi investe due distinti aspetti a seconda che ci si riferisca alla microflora endogena o a quella esogena.

I - LA MICROFLORA ENDOGENA

Io credo che oggi non si possa più sostenere, in assoluto, l'asetticità dei tessuti normali e quindi la completa asetticità delle piante. È un dogma che sta per cadere. D'altronde, l'analisi storica indica che già alcune voci, nel tempo, affermavano, contro l'idea dominante, la presenza di microrganismi nelle piante normali. Il richiamo non si limita, è chiaro, ai più antichi lavori, d'altronde oggetto di controversie, e sopra i quali può gravare il sospetto di qualche vizio di tecnica; né alle idee — diciamo pure geniali — di Portier e di Schanderl, giacché questi sono andati oltre, nelle loro conclusioni, a quanto potevano dire i reperti sperimentali conseguiti.

Mi riferisco, naturalmente, ai molto più recenti lavori (3). Da essi

into plant cells and the transcription of host cell DNA. FEBS Lett. vol. 8, p. 349.

STROUN M. e altri (1971) — *Effects of the extent of DNA transcription of plant cells and bacteria on the transcription in plant cells of DNA released from bacteria.* FEBS Lett. vol. 13, p. 161.

YAYKO D.N. e altri (1971) — *Tumor induction by Agr. tumefaciens specific transfer of bacterial DNA to plant tissue.* J. Bacteriol. vol. 108, pag. 973.

(3) Per i lavori relativi, vedi:

BUCHTA K. (1949) — *Die Isolierung von Mikroorganismen aus Samen von Leguminosen.* Landw. Jahrbücher. Bayern, vol. 27, p. 3-4.

DAWID W. (1957) — *Untersuchungen über die Entwicklungsmöglichkeit von Bakterien aus normalen Tomatengewebe.* Z. Pflanzenkrankh. vol. 64, p. 205-214.

HOLLIS J.P. (1951) — *Bacteria in healthy potato tissue.* Phytopathol., vol. 41, p. 350-366.

KARDOS J. (1964) — *Comparative studies on Datura stramonium and its symbiotic microorganismes.* Acta biol. Acad. Sci. hung. vol. 14, p. 285-292.

emerge che l'insediamento di microrganismi ambientali, con conseguente anche se non sistemica loro colonizzazione, nei tessuti normali è possibile. Tanto non è infrequente nei tessuti di organi carnosì, quali le radici fittonanti di carota, di barbabietola, e di altre piante; negli organi sotterranei di piante tuberizzanti, quale ad es. la patata; nei frutti succulenti, e d'altronde, anche nei semi e cariossidi incluso quelle del mais e del frumento.

Tanto è possibile in alcune piante legnose ad habitat idrofilo quale pioppo, salice, gattice, ontano. Tra questa microflora aspecifica occasionalmente, anche se non infrequentemente presente nei tessuti normali e la pianta probabilmente non si stabilisce — salvo le eccezioni che vedremo — alcun rapporto attivo; o se rapporti si stabiliscono, essi si risolvono negativamente per la pianta. Alcuni marciumi interni delle radici fittonanti, dei tuberi, dei bulbi, come dei frutti carnosì, alcune alterazioni di semi e cariossidi stivate, non è escluso che siano conseguenza di infezioni endogene. Così dicasi per le piante legnose. Una sorta di fermentazione metanica che si instaura nel fusto di piante diverse (salice, olmo, pioppo, platano e anche conifere), nota in America con il termine di « wetwood » o di « watermark disease » e in Germania con quel-

-
- MARCUS O. (1942) — *Ueber des Vorkommen von microrganismen in pflanzlichen Geweben*. Arch. Mikrob. vol. 13, p. 1-44.
- MONTUELLE B. (1965) — *Les bacteries hébergées par les plantes superieures*. Lille. (Quivi anche per le indicazioni dei numerosi lavori eseguiti da M. sull'argomento).
- PHILLIPSON M.N. e BLAIR I.D. (1957) — *Bacteria in clover root tissue*. Can. J. Microbiol. vol. 3, p. 125-129.
- PORTIER P. (1918) — *Les Symbiotes*. Paris.
- SAMISH Z. e DIAMANT D. (1959) — *Bacterial population in fresh healthy cucumber*. Food manuf. Vol. 34, p. 17-20.
- SAMISH Z., ETINGER-TULCZYNSKA R. e BICK M. (1961) — *Microflora within healthy tomatoes*. Appl. Microb. vol. 9, p. 20-25.
- SANFORD G.B. (1948) — *The occurrence of bacteria in normal potato plants and legumes*. Scientif. Agric. Canada, vol. 28, p. 21-25.
- SCHANDERL H. (1962) — *Der derzeitige Stand in der fage der Isolierbarkeit aus normalen, gesunden Pflanzengewebe*. Zentr. f. Bakt. II Abt., vol. 184, p. 287-289 (a parte altri precedenti lavori).
- SZILVASI S. (1942) — *Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in den lebenden Geweden der Pflanze*. Mittlg. Boten. Inst. Univ. in Sopron vol. 7, p. 1-21.
- TERVET I.W. e HOLLIS J. (1948) — *Bacteria in the sporage organs of healthy plant*. Phytopath. vol. 38, p. 960-967.
- THOMAS W.D. e GRAHAM R.V. (1952) — *Bacteria in apparently healthy pinto beans*. Phytopath. vol. 42, p. 214.

lo di « wasserzeichenkrankheit » (4) e riscontrata anche da noi in Italia, proprio qui nel pisano, su pioppo, è senza dubbio un fatto patologico (5); ma esso non è legato a microrganismi fitopatogeni, bensì a microrganismi ambientali che, penetrati e colonizzati nei tessuti normali, metabolizzano i carboidrati dell'ospite dando origine, date le condizioni di sviluppo, ad idrogeno e metano.

Ma non mancano esempi nei quali la presenza di una microflora endogena assume significato non più occasionale. Negli *ovuli*, ad es., di alcune piante alpine la presenza di microfunghi sembra costante e costante (6), come è ben noto, è la presenza di miceli nelle *cariossidi di Lolium* (ben conosciuto, al riguardo, è il caso di *L. temulentum* volendosi attribuire la sua tossicità al fungo associato), come di altre graminacee pratensi (7). Particolare caso è dato dai semi di *Datura stramonium* nell'interno dei quali vi sarebbero microrganismi capaci di elaborare un fattore presentante le proprietà farmacologiche e biologiche dell'atropina (8).

Ma non mancano altri numerosi esempi, più dei precedenti significativi stabilendosi tra pianta e microrganismi endogeni intimi e delicati rapporti. Un primo esempio è offerto dai semi di orchidee che portano associati funghi basidiomiceti solo in presenza dei quali (o per lo meno dei loro prodotti) germinano. Altri classici esempi sono dati da quelle

(4) V. tra i vari lavori:

CRANDALL B.S., HARTLEY C., DAVIDSON R.W. (1937) — *Wetwood*. *Phytopath.* vol. 27, p. 126.

HARTLEY C. e DAVIDSON R.V. (1950) — *Wetwood in living trees*. *Phytopath.* vol. 40, p. 871.

(5) MORANI V. e ARRU M. (1958) — *Accumulo di gas entro pioppi in vegetazione*. *Ric. Sci.* vol. 28, p. 146-151.

(6) CAPPELLETTI C. e CERRUTI A. (1930) — *Ricerche sulla microflora degli ovuli e degli stili di piante alpine*. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* Vol. 46, p. 339-342.

(7) V. tra l'altro:

CHAZE J. (1936) — *L'ivraie enivrante et la culture pure de son endophyte*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, vol. 203, p. 885-887.

PEYRONEL B. (1930) — *Simbiosi fungina tipo « lolium » in alcune graminacee del genere « festuca »*. *Nuovo Giorn. Bot.* vol. 37, p. 643-648.

SAMPSON K. (1935) — *The presence and absence of an endophytic fungus in Lolium temulentum and L. perenne*. *Tras. Brit. Mycol. Soc.* Vol. 19, p. 337-343.

SAMPSON K. (1937) — *Further observations on the systemic infection of Lolium*. *ibidem*, vol. 21, p. 84-97.

SAMPSON K. (1939) — *Additional notes on the systemic infection of Lolium*. *ibidem*, vol. 23, p. 316-319.

(8) KARDOS J. (1964) — *Op. cit.* in (2).

associazioni nelle quali la presenza dei microrganismi nell'interno della pianta dà luogo a formazioni nodulari ora in sede radicale, ora in sede foliare. Solo per memoria e senza entrare nel merito delle relative questioni, in sede radicale occorre ricordare l'associazione Rizobi e piante leguminose. È un'associazione a tutti familiare. A noi meno familiari, forse, sono le associazioni che portano alla formazione di noduli in piante dicotiledoni non leguminose. Tali quelle che si riscontrano in alcune Betulacee (*Alnus*), Elaeagnaceae (*Elaeagnus*, *Hippophae*, *Shepherdia*), Myricaceae (*Myrica*) Rhamnaceae (*Ceanothus*), Casuarinaceae (*Casuarina*) ecc. come dall'unito elenco. Senza entrare nella natura dei microrganismi considerati simbiotici e tra i quali si annoverano probabilmente funghi, come in *Podocarpus*, e anche alghe verdi-azzurre come in certe Cicadee, l'associazione si manifesta in tutti questi casi con esito favorevole alla pianta in quanto rende possibile alla stessa pianta l'utilizzazione diretta dell'azoto atmosferico (9). La possibilità che, oltre al meccanismo simbiotico che presiedono, tali microrganismi siano capaci di produrre sostanze fitotossiche — come ad es. la rizobitossina prodotta da *Rhizobium japonicum* (10) non porta all'associazione alcun pregiudizio.

In sede foliare, la formazione di noduli per presenza nei tessuti di microrganismi non patogeni, è da tempo nota su alcune Rubiacee tropicali nei generi *Pavetta* e *Psychotria* (11). Quivi il batterio simbiote —

(9) Vedi, tra l'altro:

BECKING J.H. (1961) — *Nitrogen fixation and mycorrhiza in Podocarpus root nodule*. Plant a. Soil, vol. 15, p. 217-227.

BERGESSEN F.J. e COSTIN A.B. (1964) — *Root nodules in Podocarpus lawrencei and their ecological significance*. Austral. J. Biol. Sci. vol. 17, p. 44-48.

BOND G. (1971) — *Root-nodule formation in non-leguminose angiosperms*. Plant a. Soil, special volume, p. 317-324.

(10) La Rizobitossina isolata da *Rh. japonica* produce necrosi sulle foglie di soia. È un aminoacido solforato che, per desolfitazione, dà un altro aminoacido, però non tossico, presente sia nella soia che nelle colture del rizobio, aminoacido tentativamente identificato in un etere della omoserina. È verosimile che la sostanza tossica consista in due molecole di questo aminoacido unite per mezzo di un legame bio-etero. È stato ipotizzato che la rizobitossina inibisca la cistationasi, e quindi la rottura della cistationina e la conseguente formazione di omocisteina (Owens L.D. (1969) Science, vol. 165, p. 18-25).

(11) A parte il primo lavoro di von Faber (Jahrb. Wiss. Botanik vol. 51, p. 285-375, 1912) si veda: De Vries J.T. e Derx H.G. — Ann. Bogoriensis, vol. 1, p. 53-60, 1950; Knösel D. — Zentr. f. Bakter. II Abt. vol. 116, p. 79-100, 1963 e vol. 116, p. 114-130, 1963; Bettelheim K.A. e altri. J. Gen. Microbiol. vol. 54, p. 177-184, 1968.

Piante dicotiledoni non leguminose provviste di noduli radicali

Famiglia	Genere	Specie
Betulaceae	Alnus	— alnobetula (= viridis), cordata, crispa, firma, glutinosa, glutinosa var. subbarbata, incana, incana var. glauca, japonica, jorullanensis var. spachii, mollis, multinervis, nitida, serrulata, sieboldiana, tinctoria var. glabra, undulata.
Elaeagnaceae	Elaeagnus	— angustifolia, argentea, edulis, longipes, macrophylla, multiflora, multiflora var. edulis, pungens, rhamnoides, umbellata.
	Hippophae	— rhamnoides
	Shepherdia	— argentata, canadensis
Myricaceae	Myrica (Eomptonia)	— asplenifolia (= C. peregrina), carolinensis, cerifera, gala, macfarlanei, rubra, sapida var. longifolia, pilulifera.
Rhamnaceae	Ceanothus	— americanus, azureus, deliyianus, fendleri, microphyllus, ovatus, velutinus
Casuarinaceae	Casuarina	— cunninghamiana, equisetifolia, frazeriana, glauca, lepidophloia, montana, muricata, quadrivalis, stricta, sumatrina, tenuissima, triangularis
Coriariaceae	Coriaria	— japonica, arborea, myrthifolia
Zygophyllaceae	Fagonia	— arabica
	Tribulus	— alatus
	Zygophyllum	— album, coccineum, decumbens, simplex
Rubiaceae	Coffea	— klainii, robusta

sul quale ancora si discute anche se taluno lo vorrebbe riferito ad un *Klebsiella* si ritrova su tutti gli organi della pianta e accompagna la stessa in tutto il suo ciclo di sviluppo. Quale sia il significato biologico di questa associazione non è ancora ben noto, giacché se taluno lo vuole riferito alla azotofissazione, altri ritengono che accanto a tale possibilità il batterio fornisca alla pianta sostanze utili al suo accrescimento. Neppure è escluso che insorgano interazioni con le citochinine (12). Gli effetti

(12) Vedi al riguardo:

- BECKING J.H. (1971) — *The physiological significance of the leaf nodules of Psychotria*. Plant. a. Soil. Special volume, p. 361-374.
- BONG G. (1967) — Ann. Rev. Plant Physiology vol. 18, p. 107-126.
- CENTIFANTO Y.M. e SILVER W.S. (1964) — *Leaf-nodule symbioses. I. Endophyte of Psychotria bacteriophila*. J. Bacteriol. vol. 88, p. 776-781.
- SILVER W.S. e altri (1963) — *Nitrogen fixation by the leaf-nodule endophyte of Psychotria bacteriophila*. Nature, vol. 199, p. 396-397.

che si hanno nelle piante sono comunque favorevoli. Fatti anlaoghi sono stati segnalati per una Mirsinacea tropicale, l'*Ardisia crispa* (13), per la *Dioscorea macroura* (14), per *Kraussia floribunda*.

Il discorso si continua, a questo punto, con l'analisi — anche questa quanto mai sommaria — relativa alla *microflora esogena*.

II -LA MICROFLORA SOGENA

— Le relazioni che intercorrono tra questa microflora e la pianta sono di due ordini. Da una parte abbiamo la microflora che non assume alcun rapporto di immediata vicinanza o di contatto con la pianta, dall'altra la microflora che prospera vicino o sopra la pianta.

La prima, in quanto condiziona il terreno in senso pedologico come agronomico non può, nel quadro delle interazioni pianta-microorganismi, essere sottaciuta. È questa microflora che assicura la continuità della Vita a livello planetario ed è ai prodotti del suo metabolismo che si trova legata, direttamente o indirettamente, la nutrizione dei vegetali. Certo, non è più il caso di richiamare tutti i relativi processi metabolici, d'altronde a tutti ben noti; basta, al nostro assunto, averne ricordata la presenza e affermata l'importanza. Un breve indugio, invece, esige l'analisi della microflora che assume rapporti topografici più immediati con la pianta.

Il discorso muove dal seme.

1 - La spermatosfera

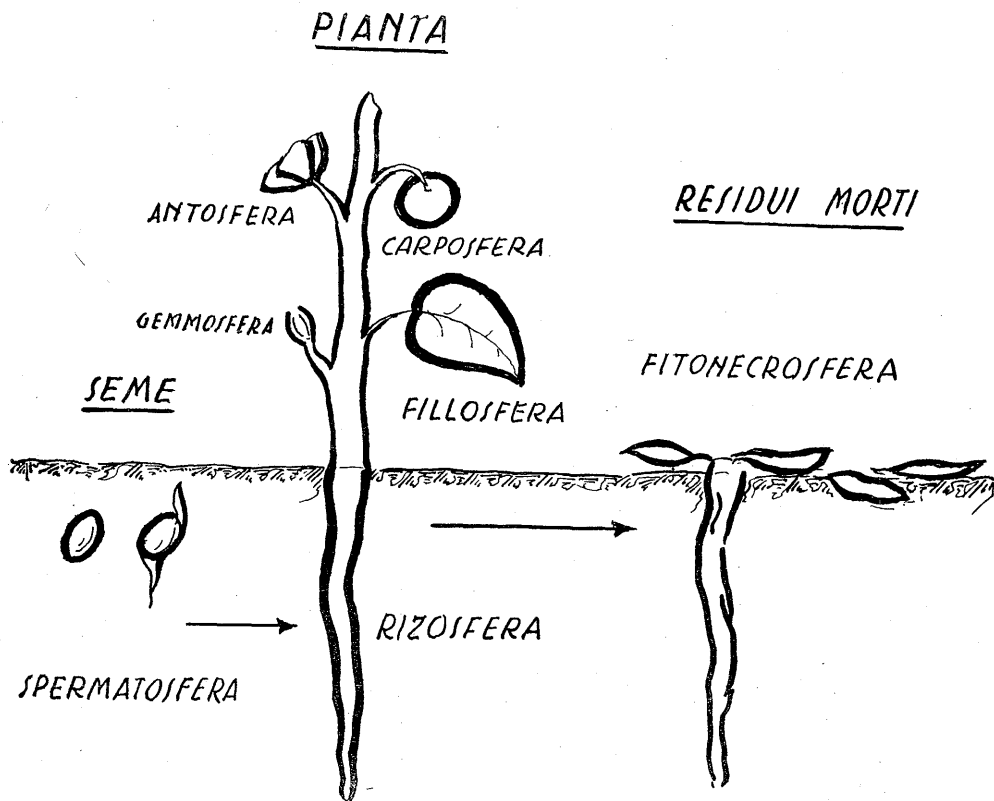
Nel 1963 pensai che fosse giusto proporre una separata definizione a quella nicchia ecologica che accompagna il seme durante la germinazione. L'evento è fugace, ma non per questo risulta meno interessante. È anche, per essere il primo memento di sviluppo della pianta, un momento delicato.

In questa nicchia ecologica i fatti microbiologici che si instaurano sono condizionati dalla microflora del seme, dalla microflora del terreno

(13) MIEHE H. (1914) — *Weitere Untersuchungen über die Bakterien - symbiose bei Ardisia crispa*. I° *Die Mikroorganismen*. Jahrb. Wiss. Bot. Vol. 53, p. 28-60.

NEMEC B. (1932) — *Ueber Bakteriensymbiose bei Ardisia crispa*. Niem. Soc. roy. Bohème, vol. 19, p. 1-23.

(14) ORR M.Y. (1923) — *The leaf glands of Dioscorea Macroura*. Notes roy. Bot. Garden, Edimburgo, vol. 14, p. 57-72.



Gli organismi vegetali costituiscono un ecosistema entro il quale la pianta occupa un posto prevalente.

e, sull'una e l'altra influenti, dalla composizione della soluzione circolante nel suolo e dalla natura delle sostanze che fuoriescono dal seme durante il periodo di imbibizione. Quanto è legato al seme è comunque ed ovviamente determinante nello stabilirsi della spermatofera tanto da dar ragione a ciò che ho chiamato « effetto-seme » (15). Sia il concetto

- (15) VERONA O. (1958) — *La Spermosphère*. Ann. Ist. Pasteur, vol. 95, p. 795.
VERONA O. (1960) — *Qualche indagine sulla microflora epifitica del seme*. Ann. Sper. Agr. Vol. 14, p. XI.
VERONA O. (1963) — *Interaction entre la graine en germination et les microorganismes telluriques*. Ann. Ist. Pasteur, vol. 105, p. 75-98.
VERONA O. (1966) — *The « seed-effect »*. Rev. Roumaine de Biologie. Ser. Bot. Vol. 11, p. 255-256.

Per altri lavori vedi le citazioni in Verona O. (1963) e inoltre:

di spermatosfera che di effetto-seme sono ormai internazionalmente accettati e sperimentalmente illustrati da vari ricercatori.

Uno dei parametri della spermatosfera è rappresentato, come si è detto, dalla microflora del seme. Non è, questa, una microflora specifica; ma nel negare tale specificità occorre subito dire che i vari semi possono acquistare una loro fisionomia microbiologica in dipendenza delle condizioni trofiche offerte dal mezzo in cui germinano. Le sostanze nutritive minerali e organiche che il seme trova nel terreno, perché proprie al terreno o perché aggiunte con la pratica agronomica della fertilizzazione, hanno importanza microbiologica non solo per l'incremento quantitativo che stimolano, ma anche per una più o meno evidente selezione che esercitano sulle varie specie. E così dicasi delle sostanze portate dal seme, tali quelle di natura polisaccaridica presenti sulla sua superficie o altrimenti quelle che esso cede via via che avanza il processo di imbibizione. Si tratta, in quest'ultimo caso, di carboidrati solubili, di aminoacidi, di vitamine, di sostanze auxiniche e in molti casi anche di sostanze antibiotiche (16). La natura e quantità di tali essudati, oggi rilevabile anche attraverso metodi rapidi quale la determinazione della conducibilità elettrica dell'acqua di lavaggio del seme germinante (17), è di particolare importanza.

Gli Agronomi sanno che la caduta della percentuale di germinazione che, rispetto ai dati forniti dalle analisi di laboratorio, si verifica

GAMBOGI P. (1964) — *Sulla microflora dei glomeruli di barbabietola*. Ann. Sper. Agr. Vol. 18, p. 815-849.

JACQ V. e DOMMERGUES Y. (1971) — *Sulfato-réduction spermosphérique*. Inst. Pasteur, Vol. 121, p. 199-206.

KATZNELSON H., PETERSON E.A. e RONATT J.W. (1962) — *Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants*. Can. J. Bot. Vol. 40, p. 1181.

NEGRU A. e VERONA O. (1966) — *Contributions mycologiques pour la connaissance de la spermatosphère des graines en germination*. Mycopath. e Mycol. Appl. Vol. 30, p. 305-313.

VERONA O. e NUTI M.P. (1971) — *Présence de microorganismes cyanamidolytiques et uréolytiques dans la spermosphère et la rhizosphère*. Ann. Inst. Pasteur, Vol. 121, p. 545-550.

(16) Si veda, per la relativa bibliografia quanto in Verona O. (1963).

(17) THOMAS C.A. (1960) — *Permeability measurements of castor-bean seed indicative of cold-text performance*. Science, Vol. 131, p. 1045-46.

TAKAYANAGI K. e MURAKAMI K. (1968) — *Rapid germinability test with exudates from seed*. Nature, vol. 218, p. 493-494.

MATTHEWS S. e CARVER M.F. (1971) — *Further studies on rapid seed exudate tests indicative of potential field emergence*. Proc. Inst. Seed Test. Ass. Vol. 36.

in campo al momento dell'emergenza, è funzione della quantità di queste sostanze (18). I microbiologi soggiungono che questo abbassamento di germinabilità non è escluso che sia dovuto, tra i vari motivi invocati e almeno in alcuni casi, al favorito sviluppo di particolari microrganismi aventi o assumenti comportamento parassitario. Ma non mancano, tra gli essudati dei semi, e conviene ripeterlo anche se già si è ricordato, sostanze aventi per i microrganismi sia azione di stimolo, che azione antibiotica.

D'altra parte non sono senza influenza, sul seme germinante, le sostanze elaborate dagli stessi microrganismi portati dal seme quando tra essi si trovino prevalenti determinate specie. Se, ad es., si trova sui semi di limone una massiva presenza di spore di *Asp. flavus* le piantine che nascono si presentano albine (19); del pari aclorofilliche si presentano le piantine nate da semi diversi, quando questi subiscano l'azione dei metaboliti di *Alternaria tenuis* (20).

Ma a parte questi casi del tutto particolari e che, in quanto tali, potevano anche essere taciuti, più in generale si verifica, nel dominio della spermatosfera e in dipendenza dell'effetto-seme, un incremento nel numero di microrganismi e quindi, come ormai denunciano varie ri-

(18) Vedi, per qualche notizia e ulteriore bibliografia:

ESSENBERG J.F. e SCHOOREL A.F. (1962) — *The relation between the results of germination tests in the laboratory and the emergence in the field*. Literatunroverzicht, n. 26, Pudoc, Wageningen.

HARPER J.L. e LANDRAGIN P.A. (1955) — *The influence of the environment on seed and seedling mortality*, VI. *The effects of the interaction of soil moisture content and temperature on the mortality of maize grains*. Ann. appl. Biol. vol. 43, p. 696.

KRAFT J.M. e ERWIN D.C. (1967) — *Stimulation of Pythium aphanidermatum by exudates from mung bean seeds (Phaseolus aurens L.)*. Phytopath. Vol. 57, p. 866.

(19) DURBIN R.D. (1959) — *Pl. Dis. Rept.* Vol. 43, p. 922-923.

(20) FULTON N.D., BOLLENBACKER K. e TEMPLETON G.E. (1965) — *A metabolite from Alternaria tenuis that inhibits chlorophyll production*. Phytopath. Vol. 55, pp. 49-51.

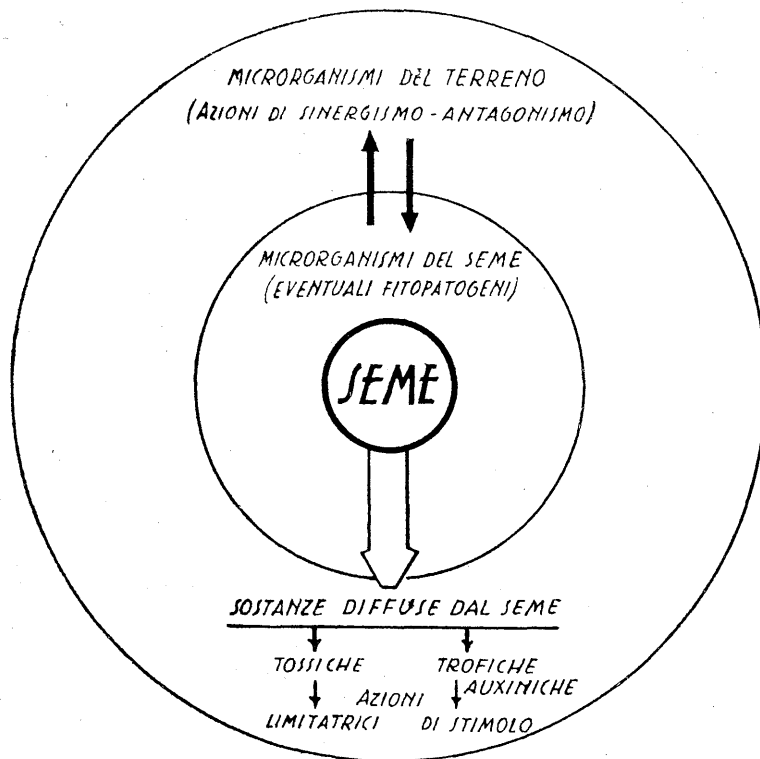
MATTHEWS S. e BRADNOCK W.T. (1968) — *Relationship between seed exudation and field emergence in peas and French beans*. Hort. Res. Vol. 8, p. 89-93.

MATTHEWS S. e WHITBREAD R. (1968) — *Factors influencing pre-emergence mortality in peas*. I. *An association between seed exudates and the incidence of pre-emergence mortality in wrinkled-seeded peas*. Pl. Path. Vol. 17, p. 11-17.

SCHROTH M.N. e COOK R.J. (1964) — *Seed exudation and its influence on pre-emergence damping-off of bean*. Phytopath. Vol. 54, p. 670-673.

WELLINGTON P.S. (1962) — *An analysis of discrepancies between germination capacity and field establishment of peas*. J. natn. Inst. agr. Bot. Vol. 9, p. 169-169.

cerche, un incremento di attività indubbiamente utile alla piantina che nasce — utili sotto il profilo trofico (aumentata, ad es., attività ammoxidante, cellulolitica, fosfolitica, etc.), utili sotto il profilo della difesa allorquando per azioni competitive od inibenti risulti contrastato lo sviluppo di germi patogeni presenti in fase saprofitaria nel terreno o altrimenti contaminanti il seme.



Rapporti tra microrganismi e seme

Le interazioni che si stabiliscono tra la microflora spermosferica e il seme che germina appaiono quindi del tutto evidenti. E discende che la loro conoscenza costituisce guida tra l'altro nella preconizzata pratica della batterizzazione del seme. I favorevoli esiti che si hanno batterizzando i semi di leguminose con i relativi Rizobi sono da tempo noti; i favorevoli esiti che si hanno, ai fili produttivi, batterizzando cariossidi di graminacee o di altre piante con ceppi selezionati di Azotobatteri, da

tempo sono documentati da parte di diversi Autori (21). L'aggiuntiva presenza di *Trichoderma lignorum* sui semi di piante arboree (specie di Conifere) e la sua azione preventiva del « damping-off » è del pari conosciuta. Ma questi non sono che pochi esempi.

Quanto ha rapporto con la spermatosfera evidentemente cessa con il superamento della fase di germinazione; e, sia pure per gradi diversi, l'ambiente microbico che si va a stabilire attorno alla radichetta prima

(21) V. per quanto concerne tali questioni:

MICHOUSTINE E.N. e CHILNIKOVA V.K. (1969) — *L'assimilation biologique de l'azote atmosphérique*. In Biologie des Sol. UNESCO.

e inoltre:

BROWN M.E. e altri (1964) — *Studies on Azotobacter species in soil III. Effects of artificial inoculation on crop yields*. Plant and Soil Vol. 20, p. 194.

CHALVIGNAC M.A. e FALCOU J. (1966) — *Ann. Inst. Pasteur*. suppl. vol. 111, p. 49.

DENARIÈ J. e BLANCHÈRE H. (1966) — *Ann. Inst. Pasteur*. Suppl. vol. 111, p. 121.

KLINCARE A.A., KRESLINA D.J. e MISHKE J.V. (1971) — *Composition and activity of the epiphytic microflora of some agricultural plants*. In *Ecology of leaf surface microorganisms*. Op. cit.

MACURA J. (1966) — *Interaction nutritionelles plante-microbes et bases expérimentales de la bacterisation des graines*. Ann. Inst. Pasteur, vol. 111, p. 9-38.

MALIZEWSKA W. (1961) — *Roczn. Nank. rol.* vol. 91, p. 103.

MISHUSTIN E.N. e NAUNCOVA (1965) — *Curr. Sci. India*. vol. 34, p. 157.

MISHUSTIN E.N. (1966) — *Ann. Inst. Pasteur*. suppl. vol. 111, p. 121.

NEELAKANTAN S. e RANGASWAMI G. (1965) — *Curr. Sci. India* vol. 34, p. 157.

ROVIRA A.D. (1963) — *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. vol. 19, p. 304.

SUNDARA RAO W.V. e altri (1963) — *Indian Journ. Agric. Sci.* vol. 33, p. 279.

VACURA V. e VACURA J. (1959) — *Fol. Microbiol.* vol., p. 200.

A parte i citati riferimenti valgano come esempio i seguenti dati.

Effetti della batterizzazione delle cariossidi di avena e di frumento con *Pseudomonas liquefaciens* (399) e *Ps. liq.* (201) - Valori rapportati al controllo fatto uguale a 100.

(parziale, da Klincare e altri)

	peso d. parte aerea	altezza della pianta	lunghezza delle radici	peso granella
Avena controllo	100	100	100	100
<i>Ps. liq.</i> 399	122	113	136	128
— 201	118	111	124	134
frumento controllo	100	100	100	100
<i>Ps. liq.</i> 399	129	123	114	111
— 201	129	128	102	114

e alle radici dopo, si fa caratteristicamente diverso. Come diverso, vedremo, è l'ambiente microbico che si insedia nelle parti epigee.

Ma procediamo con ordine.

2 - Interazioni tra microrganismi e apparato radicale

Il discorso esclude quanto ha riferimento a quelle associazioni e quindi interazioni pianta-microrganismi che si stabiliscono nell'interno dei tessuti radicali e che si manifestano attraverso reazioni morfogenetiche. A questo, d'altronde, già è stato fatto cenno.

Al di fuori di queste, i rapporti che la pianta assume con la micoflora esogena si riportano alla micorrizia da una parte e all'effetto-rizosfera dall'altra. Sul *processo micorrizogeno* è inutile fermarci; quel poco che si potrebbe dire in breve tempo non sarebbe che un ripetere cose ormai a tutti familiari. Non mancano, d'altronde, ampi lavori di sintesi (22). Se qualcosa di meno noto si può dire è richiamare, caso mai, quanto di recente è stato evidenziato con lo studio della micorrizosfera, e cioè la presenza — forse più costante che frequente — nella micoclena delle radici di *Pinus radiata* di forme batteriche — probabilmente di *Pseudomonas* — a comportamento azotofissatore (Rambelli). Se questo ritrovamento fosse ripetuto in altre micorrize esso assumerebbe senza dubbio notevole importanza nel quadro delle funzioni ammesse o ritenute esplicate dalle micorrize. Anche sull'aspetto pratico che assume la micorrizia non è il caso di dire giacché sappiamo bene come la vita di molte piante — delle Conifere in particolare — sia legata a questo processo.

C'è tuttavia un aspetto, d'ordine pratico, che per essere attuale non può essere sottaciuto. È il problema del forestamento dei coltivi pre-montani o di alta collina, oggi abbandonati. Ebbene, ben sappiamo anche per personale esperienza come questi terreni si presentino difficili all'investimento forestale qualora in essi siano assenti i funghi micorrizogeni e pertanto non si provveda con adeguati accorgimenti.

Segue quanto pertiene alla *rizosfera*. Ma anche in tal caso la relativa nozione è ormai divenuta classica e sono a tutti ben note non solo le perturbazioni dell'equilibrio tellurico in ordine alla ripartizione morfologica, fisiologica e nutrizionale dei microrganismi, ma anche le implicazioni di ordine fisiologico e, sotto certi aspetti, fitosanitario che essa comporta.

Ad ogni modo sia consentito di richiamare l'attenzione su di alcuni pochi aspetti sia di carattere generale che particolare.

(22) HARLEY J.L. — *The biology of mycorrhiza*. London 1969.

Uno degli aspetti di maggior rilievo è quello relativo al meccanismo attraverso il quale si stabiliscono le accennate perturbazioni dell'equilibrio tellurico. Senza dubbio fanno parte di questo meccanismo, per le tante notizie sperimentalmente raccolte, le secrezioni radicali. Ma sembra che molto resti ancora da indagare nella definizione di questo meccanismo, sull'apporto, dato dalle secrezioni degli stessi microrganismi anche se esso è, forse, di minore rilievo.

Non si tratta solo di eteroauxine, tipo acido β -indolacetico, che i microrganismi sintetizzano e riversano nel dominio della rizosfera; ma ad essi si deve anche la presenza di molecole complesse che oggi sappiamo assorbite dalle radici — aminoacidi, zuccheri, acidi organici e altro — tanto da potersi parlare, oggi, di una « nutrizione complementare organica della pianta » (Pochon).

Un altro aspetto, recentemente proposto, è quello che riguarda — sempre nel dominio della rizosfera — la dinamica che accompagna il possibile adattamento dei germi saprofiti verso la vita parassitaria da una parte e la vita simbiotica dall'altra. Nei funghi tale adattamento filogenetico è relativamente noto specie per quanto ha riferimento al processo di micorrizzazione. Per i batteri tali processi di adattamento non sono ancora ben noti e comunque tali da lasciare ancora un grande spazio di ipotesi alla loro interpretazione. Nei riguardi dei Rizobi, ad es., sappiamo bene come esistano ceppi non infettanti (cioè saprofiti), ceppi infettanti ma non efficienti (cioè parassiti) e ceppi infettanti ed efficienti (cioè simbiotici); ma il meccanismo che accompagna queste loro trasformazioni è al momento ignorato. Così, sempre ad es., nei riguardi di *Azotobacter*. Nonostante sia considerato un tipico saprofita, oggi sappiamo che se con ceppi di *Azotobacter* isolato dalla rizosfera di una determinata pianta si batterizzano vari semi, gli Azotobatteri si dimostrano di gran lunga più attivi sulla pianta in prossimità della quale sono stati isolati, che non su altre piante. Non sarà questo il risultato di un adattamento specifico?

Vi sono poi aspetti particolari e, tra questo, merita di essere evocato quello che si riferisce ai rapporti che la microflora rizosferica assume con i germi fitopatogeni (23). Tale aspetto è illustrato da una massa notevole di lavori che qui non è possibile richiamare, ma la cui importanza non può non essere sottolineata per le implicazioni pratiche che

(23) Vedi, sull'argomento:

VIENNOT-BOURGIN G. (1964) — *Interactions entre les champignons telluriques et les autres organismes composants de la rizosphère*. Ann. Inst. Pasteur, suppl. vol. 109, p. 21.

esso comporta ai fini fitoprofilattici. Un altro aspetto che ha valore particolare e, direi, occasionale, è quello legato alla possibile produzione di determinati composti quando, per particolari motivi, si stabilisca nel dominio della rizosfera la dominanza di alcune specie.

Tra questi composti posiamo annoverare come esempio, a parte le vitamine (24), quelli qualificabili come antibiotici, capaci questi di esplicare la duplice azione di inibitori di germi fitopatogeni e di stimolatori del metabolismo della pianta. E, ancora ad es., può essere ricordata un'altra categoria di composti biologicamente attivi, quali le « malformine ». Si tratta di ciclo peptidi (25) all'azione dei quali si deve, ad es., un anormale sviluppo delle radici del mais (26), dei germogli del fagiolo, e quelle alterazioni del tabacco note col nome di « frenching » (27) e del crisantemo note come « yellow strap leaf » (28). Ma altre sostanze, stando alla letteratura, potrebbero essere elencate (29). Sostanze ad azione diversa che potrebbero essere non dannose alla pianta, come le malformine, ma indirettamente utili come, ipotizzando, quelle ad azione insetticida (ancorché anche queste abbiano struttura ciclopeptidica) prodotte da alcuni funghi pur presenti nel suolo (30).

(24) Un recente lavoro di Blondeau informa, ad es. come nella rizosfera del colza si selezionano una microflora capace di arricchire il terreno in cianocobalamina. BLONDEAU R. (1970) — *Mise en évidence de la production de vitamine B₁₂ par la microflora rhizosphérique des plantules de Colza*. C.R. Ac. Sc. Vol. 270, p. 2040-2043.

(25) TANEUCHI S. e altri (1967) — *Phytochemistry*, vol. 6, p. 287-292.

(26) CURTIS R.W. (1961) — *Plant physiology*. vol. 36, p. 37-43.

(27) STEINBERG e altri (1950) — *Plant physiology*. Vol. 25, p. 279-288.

(28) WOLTZ S.S. (1963) — *Growth modifying and antimetabolite effects of aminoacids on chrysanthemum*. *Plant Physiology*. Vol. 38, p. 93-99.

(29) Vedi ad es.:

STILLE B. (1957) — *Schädigungen an Pflanzen-Wurzeln durch Kultur filtrate von microorganismen*. *Arch. f. Mikr.* Vol. 26, p. 71-82.

JOHNSON H.W. e altri (1958) — *Role of the nodule in the bacterial-induced chlorosis of soy-bean*. *Agron. J.* Vol. 50, p. 571-574.

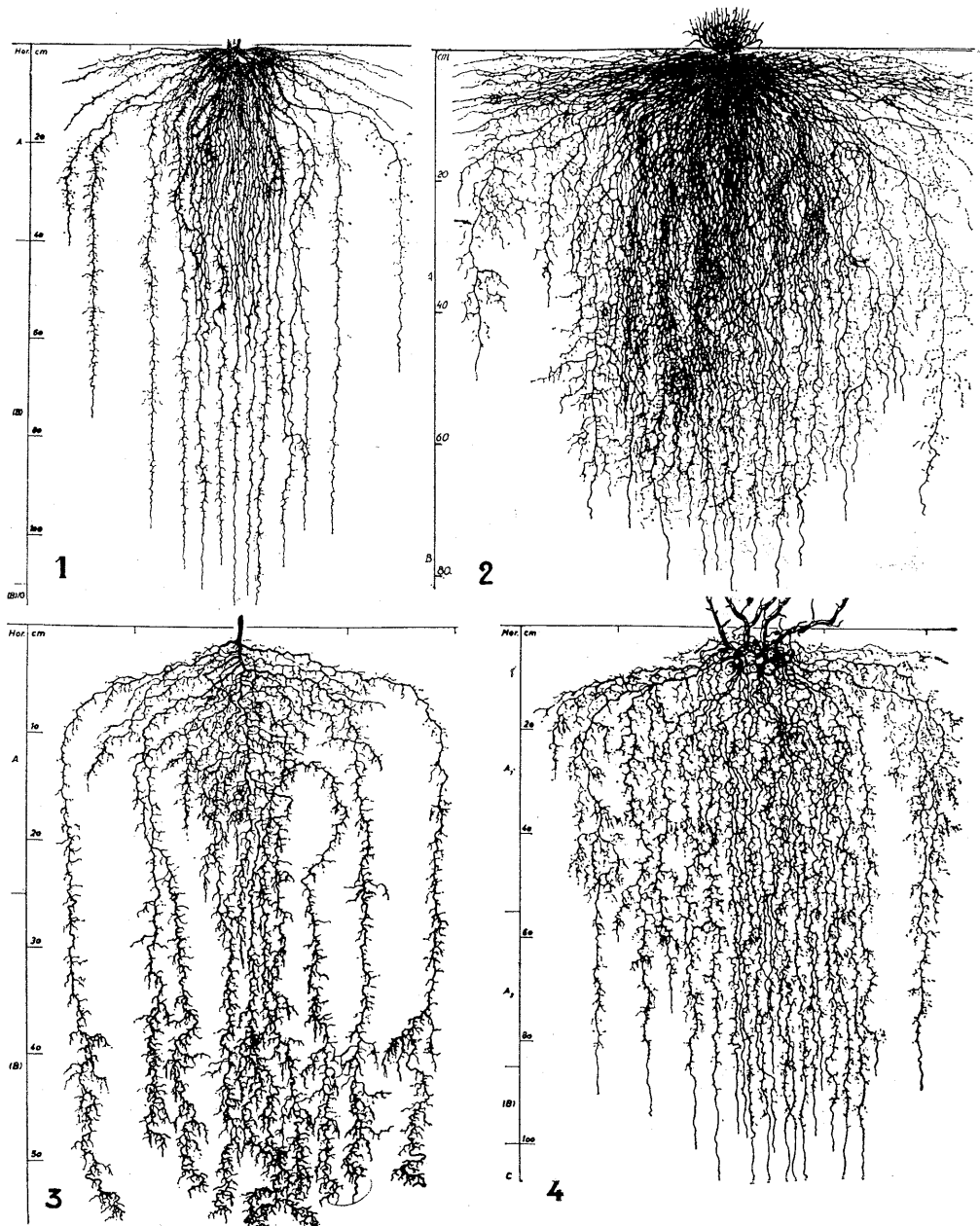
KRASILNIKOV (1963) — *The role of microorganisms in plant life*. Recent progress in microbiology. Toronto.

WINTER A. (1918) — *New physiological and biological aspects in the interrelationships between higher plants*. *Symp. Soc. Expt. Biol.* Vol. 15, p. 229-244.

(30) Tali le distrutture A, B, C, D, prodotte da *Asp. flavus Asp. ochraceus*, *Metarrhizium anisopliae*; l'asporacina prodotta da *Asp. ochraceus*; le piericidine A e B prodotte da *Streptomyces mobaraensis*, ecc.

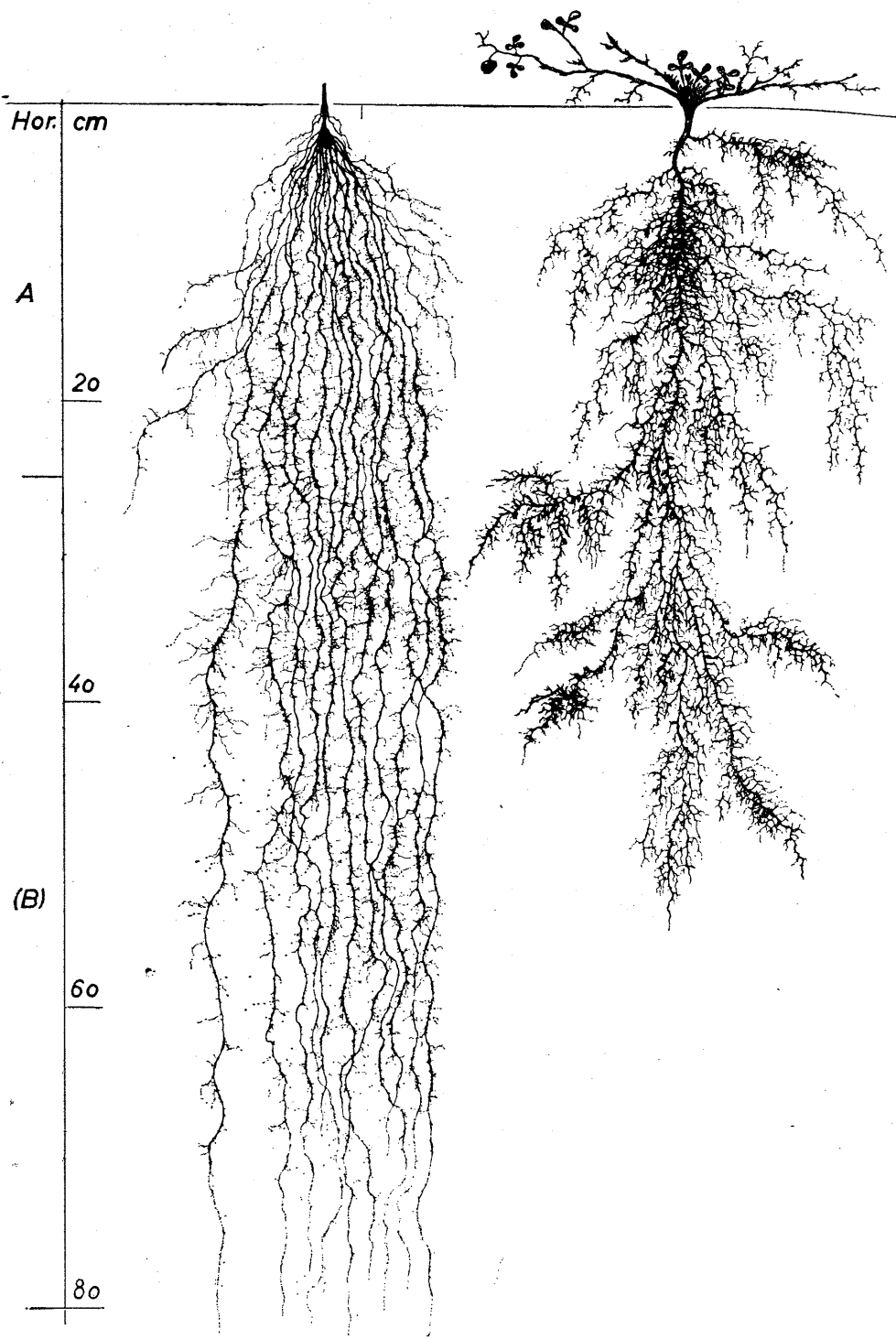
Vedi per maggiori informazioni:

TAMURA S. (1971) — *Gibberellins and other biological active substances produced by microorganisms*. In: *Biochemical and Industrial aspects of fermentation*. Edito da Sakaguchi K. e altri.

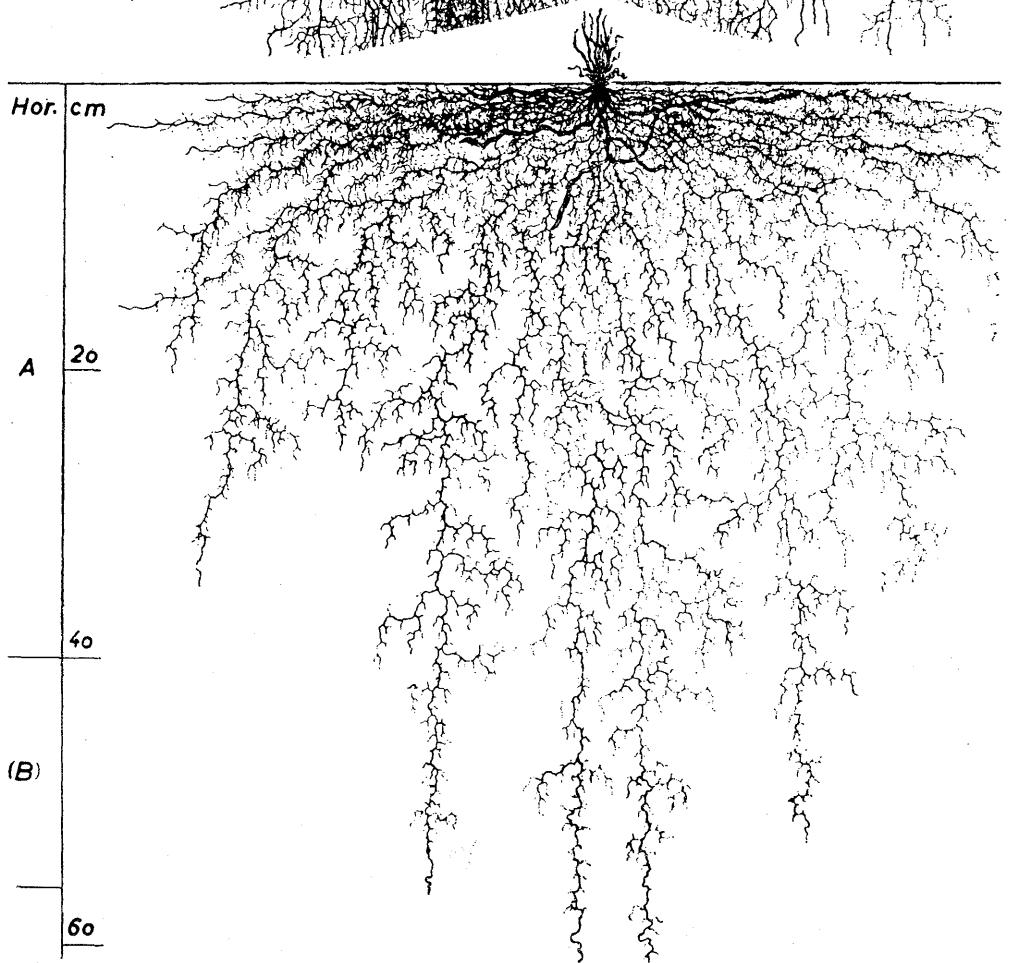
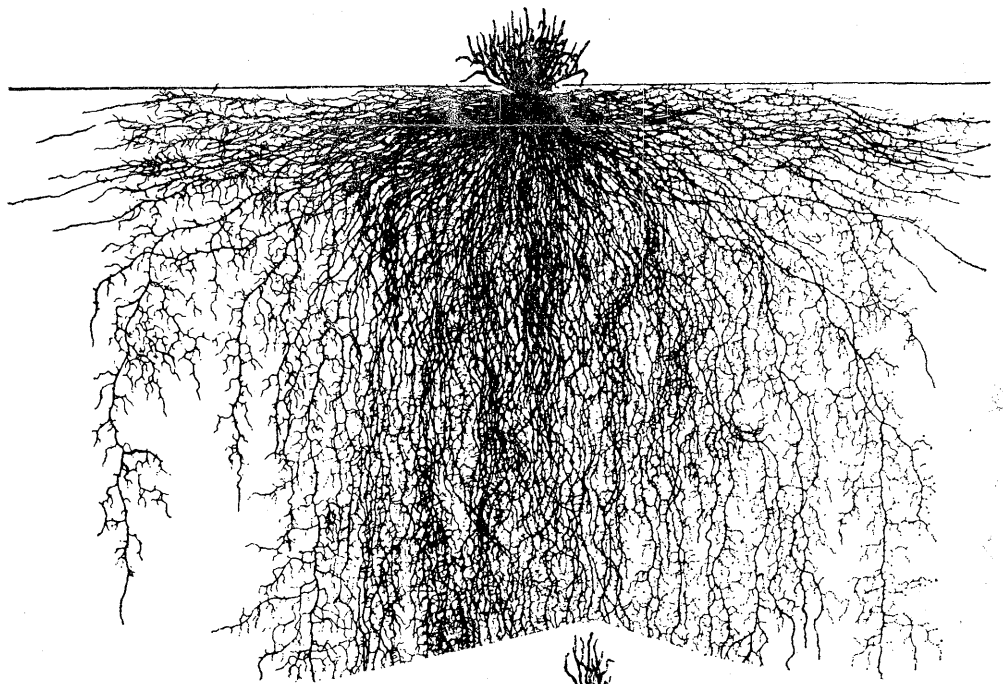


Vari tipi di apparato radicale — 1) *Zea mays*; 2) *Lolium multiflorum*; 3) *Centaurea cyanus*; 4) *Solanum tuberosum*. (da Lore Kutschera = Wurzelatlas, Francoforte 1960).

Il concetto relativo l'effetto-rizosfera può essere meglio compreso qualora si tenga presente la consistenza dello sviluppo radicale.



A sinistra *Panicum miliaceum*, a destra *Medicago lupulina*.



In alto *Lolium multiflorum*, in basso *Poa pratensis*.

3 - Interazioni tra microrganismi e parte epigea della pianta

a) La gemmosfera

Anche se le notizie che si hanno sulla « gemmosfera » (Leben 1961) non sono numerose (31) esse sono tuttavia sufficienti ad affermare la costante presenza di microrganismi su questi delicati organi delle piante.

La contaminazione non si limita alle parti superficiali. Nonostante che le parti interne si trovino tra loro strettamente contenute, tra le une e le altre è dimostrato possibile che si stabiliscano, anche nelle zone centrali più compatte, condizioni di spazio e di nutrimento tali da consentire un apprezzabile sviluppo di germi. In quanto protette, tali parti interne sono sempre sufficientemente umide, nonché provviste di sufficienti risorse alimentari in questo caso non provenienti dall'esterno ma fornite dalla pianta e quindi di origine secretiva. Può fare difetto l'ossigeno ma noi sappiamo che non pochi microrganismi vivono ugualmente bene, se non addirittura meglio, anche in condizioni di microaerofilia.

(31) Vedi:

- KEENER P.D. (1950) — *Mycoflora of buds. I. - Results of cultures from non-irradiated materials of certain woody plants.* Am. J. Bot., Vol. 37, p. 520-7.
- KEENER P.D. (1951) — *Mycoflora of Buds. II. Results of histological studies of non-irradiated buds of certain woody plants.* Am. J. Bot. Vol. 38, p. 105-110.
- LEBEN C. (1961) — *Microorganisms on Cucumber seedlings.* Phytopathology. Vol. 51, p. 553-557.
- LEBEN C. (1963) — *Multiplication of Xanthomonas vesicatoria on tomato seedlings.* Phytopathology. Vol. 53, p. 778-781.
- LEBEN C. (1964) — *Influence of bacteria isolated from healthy cucumber leaves on two leaf-diseases cucumber.* Phytopathology. Vol. 54, p. 405-8.
- LEBEN C. (1969) — *Colonization of soybean buds by bacteria: observations with the scanning electron microscope.* Can. J. Microbiol. Vol. 15, p. 319-30.
- LEBEN C. (1967) — *Population variations of epiphytic bacteria.* Can. J. Microbiol. Vol. 13, p. 1151-6.
- LEBEN C., RUSCH V. e SCHMITTHENNER A.F. (1968) — *The colonization of soybean buds by Pseudomonas glycinea and other bacteria.* Phytopathology, vol. 58, p. 1677-81.
- LEBEN C., SCHROTH M.N. e HILDEBRAND D.C. (1970) — *Colonization and movement of Pseudomonas syringae on healthy bean seedlings.* Phytopathology, vol. 68, p. 6777-80.
- HISLOP E.C. e COX T.W. (1969) — *Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves.* Trans. Br. Mycol. Soc. Vol. 52, p. 223-5
- LEBEN C. (1971) — *The Bud in Relation to the epiphytic microflora.* In: *Ecology of leaf surface microorganisms.* Ed. da Preece T.F. e Dickinson C.H. Ac. Press.

La popolazione microbica della gemmosfera è varia: si hanno quindi batteri e si hanno funghi incluso, tra questi, specie di lieviti. L'occasionale presenza di specie patogene è notoriamente possibile.

La gemma assume ovviamente significato microbiologico. Le gemme delle piante pluriennali si presentano, prendendo ad es. le piante da frutto, come il sito ove si conservano e si moltiplicano i lieviti destinati a suo tempo alla contaminazione dei frutti. In queste, come nelle piante annuali, i microrganismi ospitati dalle gemme rappresentano poi la fonte della iniziale colonizzazione delle giovani foglie. Se, per non citare altro, tanto interessa sotto il profilo ecologico, sotto il profilo economico non sono mancate sedicenti prospettive di studio come quella di rendere « residenti » nelle gemme microrganismi fissatori di azoto o altrimenti introdurvi germi capaci, attraverso il meccanismo della competizione o di più stretto antagonismo, di impedire lo stabilirsi di una fase residente ai microrganismi patogeni.

b) *La fillosfera*

Nel 1955 Lash in Inghilterra e nel 1956 Ruinen in Indonesia definirono col termine di « fillosfera » il complesso microbico che si insedia sulla superficie foliare. Le condizioni che concorrono a tale insediamento sono rappresentate dai germi che, generalmente provenienti dal terreno, si trovano nell'aria; dalla quantità o natura degli essudati prodotti dalla foglia; dalla struttura della superficie foliare; dal microclima (temperatura e umidità) che si stabilisce sulla foglia.

Un'analisi di tutti questi fattori non è qui possibile; né, forse, necessaria sia perché non mancano estesi lavori d'insieme (32), sia perché la nozione di fillosfera incomincia ad essere familiare non solo ed ovviamente ai Microbiologi, ma anche agli Agronomi. Solo, quindi, qualche richiamo e qualche considerazione incominciando col ricordare le caratteristiche fisico-chimiche di questo particolare ambiente ecologico.

Le condizioni micro-climatiche in cui si trova la foglia (temperatura, umidità, ventilazione) assumono non solo importanza ai fini degli scambi energetici che si hanno tra foglia e ambiente (33); a parte que-

(32) Per dettagliate informazioni vedi:

Ecology of Leaf Surface micro-organisms. Edito da T.P. Pretece e C.H. Dickinson. Accad. Press. 1971.

(33) L'intensità di tali scambi energetici è condizionata dalla struttura della foglia e dai fattori climatici. Comunemente ciò che viene preso in considerazione è: 1) l'evaporazione dell'acqua o calore latente (LE); 2) la sensibilità al calore (convezione e conducibilità) (H); 3) la conduzione entro i tessuti fogliari (G); 4) i processi

sto, il micro-clima che avvolge la foglia rappresenta un fattore particolarmente influente sullo sviluppo della microflora che popola la fillosfera. Gli ecologi ci informano che tale micro-clima non coincide affatto con il clima dell'ambiente avendosi addirittura variazioni di temperatura e di umidità nelle diverse parti (centrali o marginali, ad esempio) della stessa foglia.

Le condizioni chimiche sono determinate dagli essudati. Che le foglie riversino, all'esterno, sostanze diverse non è nozione di oggi. Se non si fosse abituati a dimenticare i lavori qualificati vecchi si vedrebbe che sull'argomento già si soffermò Stefano Hales nel 1727 e poi De Saussure nel 1804. È vero peraltro che sullo stesso argomento si è incominciato a speculare solo in questi ultimi decenni ed è vero che più estese e precise informazioni si sono avute quando la ricerca è stata sorretta da nuove metodologie. Sappiamo così che la quantità di sostanze che rilasciano le foglie non è indifferente pur variando notevolmente, si capisce, da pianta a pianta, e per una stessa pianta, secondo il suo stato nutrizionale, secondo l'età, secondo il clima. Riporterò qualche dato, dopo.

Circa la natura di queste sostanze la letteratura ricorda: 1) Composti minerali, incluso macro e microelementi; 2) composti organici quali zuccheri, sostanze pectiche, acidi organici, alcaloidi, composti fenolici... 3) regolatori di sviluppo, quelli gibberelline e vitamine.

L'apporto quantitativo è dato soprattutto dai sali minerali. Sono decine di Kg/ettaro-anno di K, Ca, Mg e anche P che la pianta rilascia e che permangono sulle foglie fino a che l'acqua di pioggia non le riporta al terreno. Certo, non tutti gli elementi vengono rilasciati con uguale facilità. Con la tecnica dei radioisotopi si è visto, ad es., che più facilmente degli altri vengono rilasciati Na e Mn e, più difficilmente, Fe, Zn, Cl.

Di tale rilascio non sono responsabili i soli stomi, ma vi concorrono anche altri meccanismi che qui non interessa ricordare (34).

metabolici di fotosintesi e di respirazione (P); 5) la radiazione (R). In genere si stabilisce una conduzione di equilibrio per cui:

$$R + LE + H + G + P = O$$

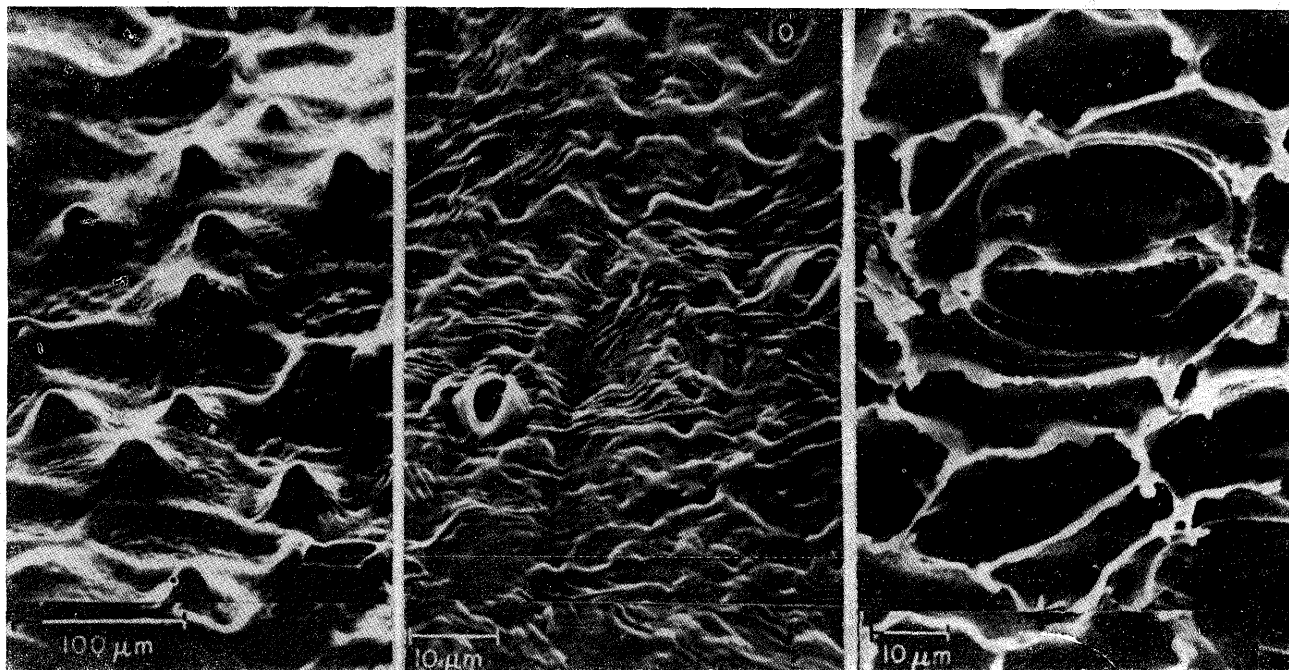
ma variazioni, per il positivo o negativo variare dei fattori, è possibile.

v. = BURRAGE S.W. — *The micro-climate at the leaf surface*. in: Preece e Dickinson op. cit.

(34) V. per la relativa bibliografia:

TURNER H.B. — *Leaching of substances from plants*. In: Preece e Dickinson. Op. Cit.

BLANEMAN J.P. — *The chemical environment of the leaf surface in relation to growth of Pathogenic Fungi*. Id.



La membrana cuticolare delle foglie presenta strutture particolarmente adatte ad ospitare e a far sviluppare ogni specie di microrganismo (a sinistra = *Gasteria planifolia*; al centro = *Malus pumila*; a destra = *Ilex aquifolium*).

(da N.D. Hallam e B.E. Juniper)

Ebbene, su questo substrato non meraviglia quindi che, in rapporto alle condizioni microecologiche del terreno e al grado di contaminazione dell'aria, si insedi una ricca microflora e che questa, in relazione alle condizioni climatiche, trovi poi facile motivo di sviluppo. Neppure meraviglia quindi, che a seguito di tale sviluppo, si stabiliscano a livello fogliare interazioni diverse. Non è il caso di indugiarsi sulla natura di questa microflora; basti dire che non c'è gruppo microbico, alghe incluse, che non sia rappresentato, sia pure con variazioni sensibili da pianta a pianta, secondo la posizione e l'età delle foglie, e da luogo a luogo.

L'incidenza che tale rivestimento microbico ha sulle principali funzioni delle foglie — assimilazione, respirazione, traspirazione — sono facilmente intuibili. Ma l'azione della fillosfera si manifesta anche ad altri livelli.

In primo luogo a livello trofico per la presenza tra i microrganismi residenti, ad es., di azotofissatori liberi sia del tipo *Azotobacter*, sia nelle zone tropicali, del tipo *Beijerinckia* sia ancora di altri tipi (35). Anche se non si hanno dati quantitativi sulla misura con la quale la fillosfera contribuisce alla nutrizione azotata della pianta il fatto è, senza dubbio, di grande rilievo. D'altronde, non è facile avere dati quantitativi giacché nel processo intervengono vari fattori tra i quali le stesse associazioni microbiche. A questo riguardo è stato rilevato, ad es., come la presenza di lieviti (specie di *Rhodotorula*) sia capace di decomporre la cutina e così eliminare la cuticola con il duplice effetto di facilitare gli scambi dei composti organici tra le cellule del mesofillo e la microflora della fillosfera, e nello stesso tempo, fornire ai fissatori d'azoto con i composti di degradazione della cutina un substrato supplementare (36).

Non mancano azioni, poi, a livello ormonico. Non è possibile, per brevità, portare esempi; ma è indubbia l'interferenza che si può stabilire tra gli ormoni della pianta e le sostanze a comportamento ormonico prodotte dai microrganismi. Ne risultano azioni dirette, o anche indirette inducendosi cambiamenti nella sintesi o anche nella degradazione o inattivazione degli ormoni che la stessa pianta elabora (37).

Infine, un lungo discorso meriterebbero i rapporti che intercorrono

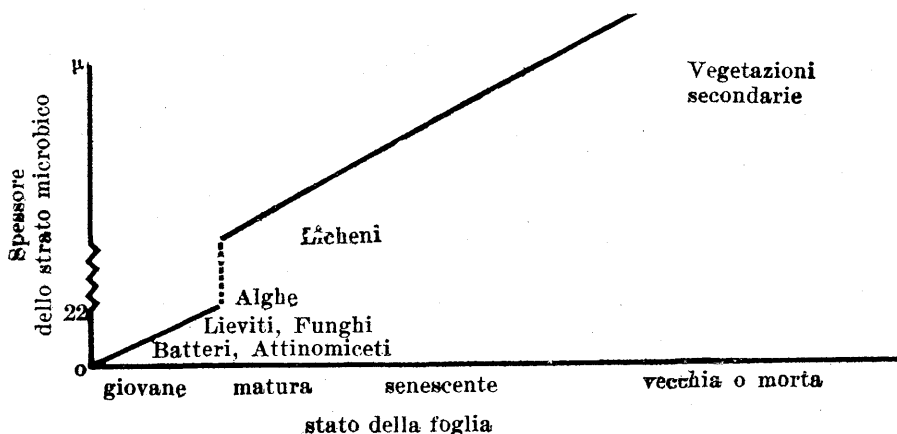
(35) RUINEN J. (1965) — *The phyllosphère. III. Nitrogen fixation in the phyllosphère.* Plant and Soil, vol. 22, p. 375-394.

(36) RUINEN J. (1966) — *The phyllosphère. IV. Cuticle decomposition by microorganisms in the phyllosphère.* Ann. Inst. Pasteur, suppl. al Vol. III, p. 342-346.

(37) v. ANDEL O.M. e FUCHS A. (1972) — *Interference with plant growth regulation by microbiological metabolites.* In: Phytotoxins in Plant diseases, ed. da Wood R.K.S. e altri. Acad. Press.

tra pianta, fillosfera e microrganismi fitopatogeni. Quello che qui si può dire è che, solitamente, la microflora fillosferica costituisce freno allo sviluppo dei parassiti e questo per azioni di ordine competitivo (sia di spazio che trofico) come per la formazione da parte dei microbi normalmente residenti, di sostanze inibenti la germinazione, o anche lo sviluppo, dei germi fitopatogeni (38).

Al di fuori di quanto riferito altro si potrebbe aggiungere su fatti che, pur legati alla fillosfera, vanno al di là dei rapporti che questa as-



Il mantello microbico di una foglia.

sume direttamente con la pianta. Intendo riferirmi a casi legati a particolari situazioni o altrimenti a episodi occasionali, comunque di rilievo sotto il profilo economico. Alludo, in breve, ad alcuni processi di micotossicosi qua e là denunciati a carico degli animali di allevamento (39). L'annualmente ricorrente caso, in Nuova Zelanda, dell'eczema facciale che colpisce i ruminanti è uno di questi; ne è causa *Pithomyces chartarum* o, meglio, le sporodesmine che esso produce.

L'estrogenismo denunciato sui suini, ma anche su altri animali nelle regioni più diverse è un altro esempio: in tal caso agiscono sostanze prodotte da funghi diversi, ma soprattutto da specie di *Fusarium*. E altri

(38) Per maggiori notizie vedi:

Ecology of leaf surface micro-organisms. Edito da T.F. Preece e C.H. Dickinson, Acad. Press, 1971.

(39) Per maggiori notizie vedi:

MOREAU CL. — *Moissures toxiques dans l'alimentation*. Paris, 1968.

Microbial Toxins, vol. VII, ed. da S. Kadis e altri. Acad. Press, 1971.

esempi si potrebbero aggiungere giacché, soprattutto sui pascoli permanenti non è infrequente rinvenire funghi capaci di produrre micotossine, specie del tipo delle epipolitiadiossopiperazine o del gruppo del 12, 13-leprossitricotecene. È vero che questi agenti tossigeni possono essere presenti in tutti gli organi della pianta e quindi anche su semi e cariossidi; ed è vero che la loro invasione massiva si verifica in genere durante la conservazione. Ma è anche vero che questi microfunghi tossinogeni fanno pur parte, prevalendovi o meno, della microflora che popola la fillosfera.

Neppure è da escludersi che debba riportarsi a fatti del genere quell'oscura malattia del bestiame, ad eziologia ancora non nota, non rara in alcune regioni d'Europa, ma anche degli Stati Uniti, conosciuta col nome di « tetano d'erba » (40).

Comunque si tratta, come è stato detto, di casi particolari che oltretutto esulano, a rigore, dai rapporti che la fillosfera direttamente assume con la pianta. La pianta fornisce solo supporto e alimento. La fillosfera, come la spermatosfera e la rizosfera, costituisce, ad ogni modo, un fatto biologico reale e costante, con le implicazioni che comporta.

Nelle parti epigee sono ancora da ricordarsi due siti: l'antosfera e la carposfera.

c) *L'antosfera*

Le parti del fiore che sono più interessate ai rapporti con il mondo microbico sono, per le notizie che abbiamo, i *nettari* e il *polline*.

Non stupisce che i *nettari* costituiscono un sito di favorevole sviluppo microbico sia per i germi provenienti dall'ambiente, sia per quelli portati dagli insetti. Né stupisce che, in conseguenza del loro contenuto, la flora sia rappresentata da lieviti. Tra questi si annoverano specie diverse anche se talune appaiono dominanti.

Come noto, queste specie si rinvencono anche in altre parti della pianta, in particolare nelle escrezioni mucose degli alberi nonostante qui, a differenza dei nettari, si trovino con più frequenza lieviti sporigeni (*Pichia*, *Hansenula*).

Passando al polline esso non ospita, per quanto sappiamo, una microflora normale. È però possibile che esso ospiti germi a comportamento parassitario. I Microbiologi indicano quali parassiti del polline

(40) Per ulteriori notizie oltre a quanto riportato in C. Moreau (39), vedi: VOISIN A. — *Tétanie d'herbe*. La Maison Rustique, 1963.

specie di *Rhizophydium*, *Lagenidium* Schenk, *Chytridium* Braun, *Phycochytrium* Schrocker...

Dobbiamo notare come singolare la presenza esclusiva delle specie di questi generi, dato che si tratta di Ficomiceti appartenenti a un gruppo avente particolari esigenze di ambiente e particolari esigenze nutrizionali. Pertanto è verosimile che il polline contenga particolari composti richiesti da questi micromiceti. Il polline non è infatti senza azione sullo sviluppo dei microrganismi e tanto va segnalato in quanto nella pianta a impollinazione anemofila è possibile che esso si depositi massivamente, durante la fioritura, sulla superficie delle foglie. In tal caso è dimostrato che la sua presenza stimola considerevolmente lo sviluppo, nell'ambito della fillosfera, sia dei funghi a micelio, sia dei lieviti come, d'altra parte, lo sviluppo di alcune specie patogene quali, ad es., *Botrytis cinerea* su fagiolo (Ogawa e English, 1960... Cru-Cho, 1970), *Alternaria brassicicola* su cavolo (Channon, 1970), *Fusarium graminearum* su grano (Strange e Smith, 1971), *Helminthosporium sativum*, *Septoria nodorum* e *Puccinia recondita* su riso (Fokkema, 1971)... (41).

In queste specie, diremo per inciso, che il polline non solo ne sollecita lo sviluppo, di tanto essendo responsabile una sostanza idrosolubile, termostabile e dializzabile, ma anche ne aumenta l'azione patogena, inducendo negli stessi patogeni la formazione di quantità veramente elevate di enzimi degradanti le pareti cellulari (poligalatturinasi e Cx-cellulasi).

-
- (41) CHU-CHON M.M. (1970) — *Biological interactions on the host surface influencing infection by Botrytis cinerea and other fungi. Pollen grains.* Diss. Leeds.
- CHU-CHON M. e PREECE T.F. (1968) — *The effect of pollen grains on infections caused by Botrytis cinerea.* Ann. appl. Bot. vol. 62, p. 11-22.
- FOKKEMA N. (1968) — *The influence of pollen on the development of Cladosporium herbarum in the phyllosphere of rye.* Neth. J. Pl. Path. Vol. 74, p. 159-165.
- MANSFIELD J.W. e DEVERALL B.J. (1971) — *Mode of action of pollen in breaking resistance of Vicia faba to Botrytis cinerea.* Nature, 232: 339.
- OGAWA J.M. e ENGLISH H. (1960) — *Blossom blight and green fruit rot of almond, apricot and plum caused by Botrytis cinerea.* Pl. Dis. Repr. 44, p. 265-268.
- CHANNON A.G. (1970) — *Tests of fungicides against Alternaria brassicicola and studies on some factors enhancing attack by the fungus.* Ann. Appl. Biol. Vol. 65, p. 481-487.
- STRANGE R.N. e SMITH H. (1971) — *A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by Fusarium graminearum.* Physiol. Pl. Path. Vol. 1, p. 141-180.
- FOKKEMA N.J. (1971) — *The effect of pollen in the phyllosphere of rye on colonization by saprophytic fungi and on infection by Helminthosporium sativum and other leaf pathogens.* Neth. J. of Plant Pathology, vol. 77 (suppl. n. 1).

d) *La Carposfera*

Un lungo discorso comporterebbe la descrizione della microflora che costantemente accompagna il frutto (carposfera, Tésic 1965) (42) data la vastità delle informazioni che forniscono antiche e recenti indagini. Senza qui evidenziarne le differenze in qualche misura registrabili da frutto a frutto secondo la loro specifica natura e struttura, e le differenze che si hanno, sempre sotto il profilo microbiologico a seconda delle zone climatiche (ad es. tropicali e temperate) ove essi maturano, diremo che ogni gruppo microbico è più o meno rappresentato sulla loro superficie. Cambiano, se mai, durante la maturazione, i rapporti qualitativi. Vi sono quindi funghi a micelio, sia pure in fase sporale più che in fase di propagoli, incluso — specie in certi frutti (pomodoro ad es.) — l'ubiquitario artrosporulante *Geotrichum candidum* Link. La presenza di micromiceti massivamente sviluppati, tanto da interessare anche i semi e capaci di produrre sostanze tossiche per l'uomo e gli animali (come offre esempio l'*Aspergillus flavus* e altri Aspergilli produttori di aflatossine, e alcuni *Fusarium* produttori di tossine estrogene) è occasionale, ma possibile.

Vi sono quindi non pochi batteri, particolarmente rappresentati da batteri lattici eterofermentanti (tra i quali il gruppo dei *coli*-simili), e talvolta anche acetobatteri oltre alle comuni specie di *Pseudomonas*, *Archromobacter*, *Flavobacterium*. Tra questi batteri e i frutti che li ospitano non sembra che nelle condizioni normali si stabiliscano particolari interazioni. Queste possono però insorgere e con esito economicamente negativo quando tali microrganismi hanno modo di colonizzare nei tessuti interni a seguito di lesioni o microlesioni dovute ad azioni meccaniche o a punture di insetti. I danni, ad es., che si producono nelle olive a seguito dell'infestazione dacica sono forse più dovuti al conseguente sviluppo dei microbi della carposfera che non all'azione diretta dell'insetto (Verona e Picci) (43).

Accanto ai batteri e ai funghi a micelio vi sono infine i lieviti. In molti frutti, massime in quelli zuccherini, questi sono addirittura qualifi-

(42) TESIC Z. (1965) — *The unification of systems for phytosphère classification and of methodes for their microbiological investigation*. Proc. Symp. on Relationships soil micr. a. plant. Praga.

(43) VERONA O. (1950) — *Sopra i microrganismi presenti nelle olive colpite dal *Dacus oleae* e sulla loro attività lipolitica*. Ann. Facoltà di Agraria. Pisa, vol. XI, p. 41.
PICCI G. (1959) — *Ancora sulla microflora presente nelle olive colpite dal *Dacus oleae**. Ibidem, vol. XX, p. 65.

canti la carposfera giacché, anche se scarsi all'inizio della maturazione, si fanno via via sempre più abbondanti fino a divenire prevalenti. Le specie presenti sono quanto mai numerose (44). La loro importanza, quando si tratti di frutti soggetti a processi trasformativi, è a tutti ben nota.

Finalmente non mancano nella carposfera, anche se la loro presenza si deve ritenere occasionale, microrganismi patogeni. Come avviene nelle altre regioni, le interazioni che si stabiliscono, in tal caso, tra microrganismi della carposfera e pianta si svolgono in più direzioni giacché interazioni si stabiliscono anche tra microrganismi residenti e microrganismi patogeni.

4 - La fitonecrosfera

Quanto è stato sommariamente esposto non deve intendersi un insieme di eventi gli uni dagli altri indipendenti e neppure una serie di eventi statici.

Nello stabilirsi delle varie accennate interazioni non è detto che le varie regioni microbiologiche non interferiscano tra loro, in diverso grado e a diverso livello, con ovvie variazioni nel tempo. Si tratta, infatti, di interazioni caratterizzate da un intenso dinamismo che non si esaurisce neppure con la morte o, nel caso delle piante coltivate, con la raccolta dell'intera pianta o dei suoi prodotti. Il non sopprimibile mondo microbico vi rimane associato e se prima si manifestava compartecipe della vita della pianta, ora si fa strumento preminente del suo disfacimento. Si delinea il formarsi, quindi, di un nuovo ambiente e il formarsi intorno agli organi morti di un nuovo mantello microbico che, in analogia agli altri ambienti, potrebbe chiamarsi con una brutta parola *fitonecrosfera*.

La pianta, in questo momento, interviene peraltro passivamente sia pure in maniera diversa in rapporto alla struttura istologica e alla composizione chimica delle parti cadute o rimaste nel suolo. Le influenze che si portano sulla microflora attiva non sono di poco conto. Il mantello microbico che si instaura nelle aghiformi foglie delle conifere, nelle foglie di quercia o di pioppo, oppure nelle foglie di pomodoro come nelle foglie di una graminacea, oppure anche nei culmi di frumento re-

(44) Sopra la microflora dei frutti, specie sulla microflora zimogena, la letteratura offre una massa veramente notevole di informazioni.

sidui della mietitura, non è evidentemente lo stesso e questo indipendentemente dalle influenze esercitate dal clima-terreno.

D'altro lato neppure è lo stesso l'esito del disfaccimento molto dipendendo dalla natura dei microrganismi che lo iniziano prima e lo completano dopo.

Tale sorta di interazioni ci porterebbero, nel discuterle, oltre i limiti che ci siamo imposti e quindi su di esse non possiamo fermarci. Ma a nessuno ne sfugge l'importanza. Nel dominio della pedogenesi basterebbe pensare alla formazione e all'evoluzione dei terreni podsolici; nel dominio dell'economia naturale e dell'economia agricola e forestale basterebbe pensare alle molteplici azioni che accompagnano i processi di umideumificazione. Quello che oggi si chiama, ad esempio, « effetto lettiera » è legato a questi processi, senza dire di quei casi, particolari, sempre a tali interazioni legati, qual'è — per citare un solo esempio — quello della « stanchezza » del suolo.

*

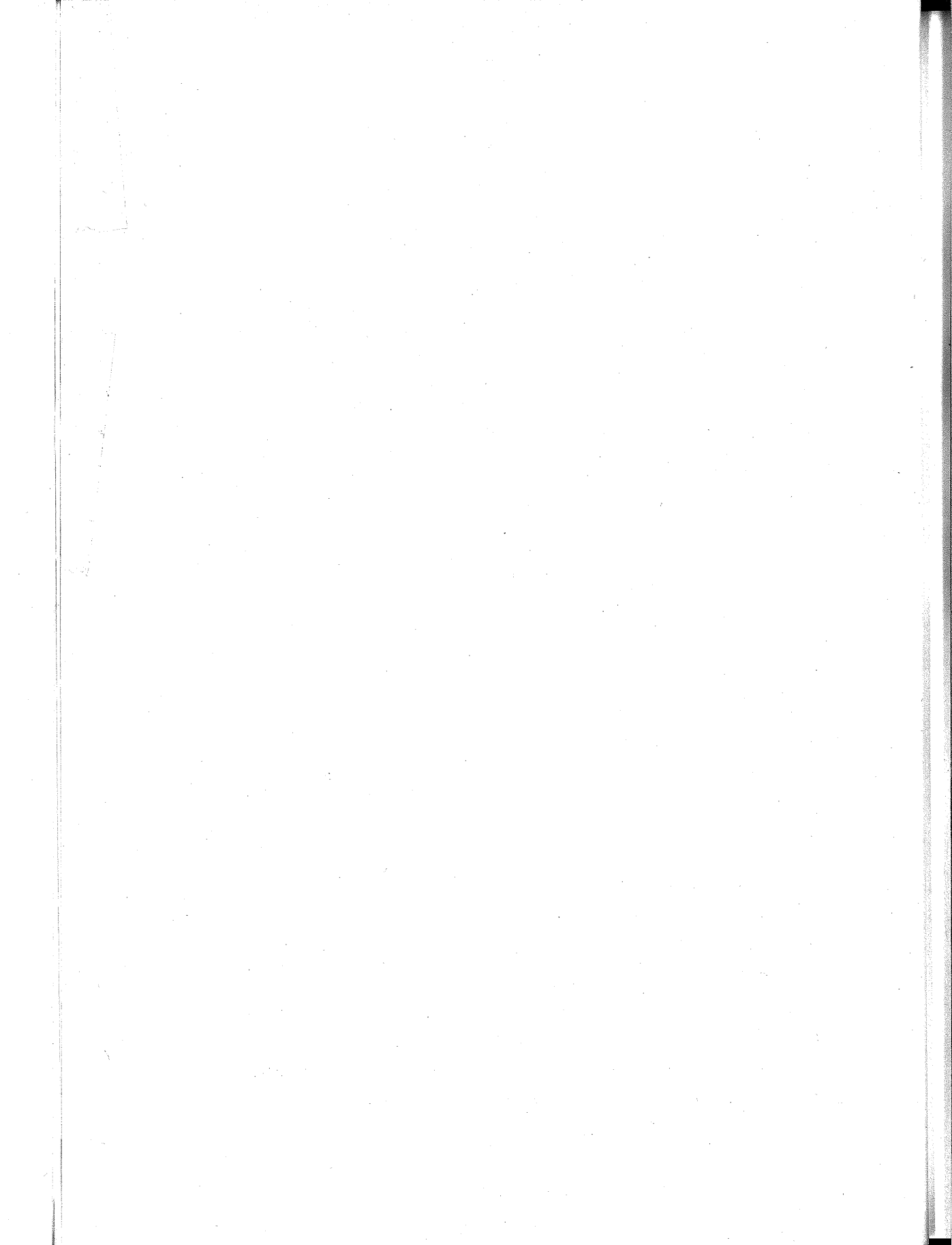
* *

Il tempo limitato suggerisce di chiudere ormai questo sommario rapporto. Debbo solo soggiungere che quanto ho avuto modo di dire si riferisce esclusivamente all'ambiente microbico che accompagna la pianta nelle sue normali condizioni di vita e non alla pianta, quindi, che subisce i vari interventi agronomici. In tal caso, a seconda della natura di tali interventi, mutano, è chiaro, le caratteristiche che accompagnano la spermatosfera, la rizosfera, la fillosfera.

Nel terminare, vorrei dire che l'oggetto del presente rapporto suggerisce varie considerazioni di ordine pedologico, di ordine ecologico, di ordine agronomico. Ma l'indugio non è consentito. Valga quindi, per tutte, l'unica considerazione seguente:

Nelle condizioni naturali d'ambiente i vegetali tutti, compreso quelli che l'uomo coltiva, non sono che degli ecosistemi o, se si vuole, delle biocenosi anche se negli uni (o nelle altre) la componente maggiore e quella a tutti nota è rappresentata dalla pianta. Gli eventi naturali, al pari degli interventi agronomici, non si portano pertanto sulla sola pianta, ma su tutti i componenti il sistema e quindi anche sui microrganismi alla pianta correlati e su di essa influenti.

Le implicazioni che questa considerazione comporta sono certamente chiare, Signori, alla loro intelligenza.



DEPARTMENT OF SOILS AND PLANT NUTRITION,
UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY (U.S.A.)

ARTHUR DOUGLAS MCLAREN

CONSECUTIVE BIOCHEMICAL REACTIONS IN SOIL
WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE NITROGEN CYCLE

Because the Space Agency, N.A.S.A., in the United States is interested in looking for life on Mars, those involved should ask how we know life when we see it. It turns out to be a very difficult question. There are some things we know and cannot tell: for example, if I find someone on the floor I would be rather quick to guess whether I should call the doctor or the undertaker, but I would have some difficulty in telling someone how I understood this.

Of course there are direct tests. If we could see some « creatures » walking around, we would probably be satisfied. But if one is looking for microorganisms, it may be difficult to distinguish between a microorganism and a dust particle. One can try to culture microorganisms, but then the question comes up as to what shall we try to feed such foreign microorganisms. A presumptive test would be to look for enzymes on the surface of Mars. Can we assume that the soil of Mars is anything like the soils of the Earth? The colour of the surface of Mars suggests that Mars may consist of a lateritic, reddish soil; in this soil there may be some organic matter but recent tests with rockets that have flown by the planet Mars suggest that Mars has almost no nitrogen or oxygen. With no oxygen, ultraviolet radiation on the surface must be most intense, and because there is no atmospheric nitrogen there can only be a very small amount of protein material. Even if life existed at one time, it may be difficult to find evidence for it. Since the surface of the planet is probably sterilized from radiation it may be necessary to get a sample from underneath.

The next question is what soil enzyme should one look for; there are few organic compounds that can withstand the temperatures required to sterilize the rockets prior to flight. In order to sterilize the rockets the plan is to use temperatures of 130°C. One organic substrate for an enzyme that can withstand such a high temperature is urea. Since the enzyme urease is found in most earth soils (19) we have designed a sensitive test with radioactive urea. In this test urease acting on urea liberates $^{14}\text{CO}_2$ which is radioactive, plus NH_3 . By measuring radioactive CO_2 we



Il prof. A.D. Mc Laren mentre tiene la conferenza sul tema: Consecutive biochemical reactions in soil, with particular reference to the nitrogen cycle.

have a very sensitive test indeed. Ammonium adsorbed by soil colloids can also be measured as an alternate after release from soil by alkali. While this test was being developed N.A.S.A. has failed to find nitrogen on Mars and this organization is therefore somewhat less keen on looking for enzymes. Nevertheless we have been having a closer look at urease activity on Earth and I shall begin my story today with urea and urease on Earth.

In nature animals have been secreting urea all over the surface of the Earth for millions of years. Furthermore two very popular fertilizers in agriculture today are either urea or urea co-polymerized with resin.

Nature has provided a means of cycling urea nitrogen. Since urease, as well as some other enzymes, seems to be present in extracellular organic matter in soil, questions arise as to how long enzyme activities may persist and in what state these are preserved. Samples of soil (about 35) were collected fresh and from buried and stored sources, and tested for different activities, the sensitivities of which are given in Table I (18).

Some representative data for a few of the soils are given in Table II. Aiken (clay), Columbia (fine sandy loam), Dublin (clay loam) and Yolo

Table I. — Sensitivity of enzyme assays.

Activity	Product	Minimum detectable μM/g soil
Catalase	O ₂	0.1
Dehydrogenase	triphenylformazan	0.001
Esterase	phenol	0.005
Phosphatase	beta-naphtol	0.02
Urease	¹⁴ CO ₂	0.008

(silt loam) soils stored 6 to 12 years (not listed) had all five enzyme activities.

Measurable dehydrogenase activities were detected in relatively fresh soils only; these did not reflected microbial numbers or organic matter present but may be correlated with endogenous respiration rates of active microbes.

Urease and phosphatase activities were observed in circa 9000 year-old permafrost peat soil samples whereas in a 32,000 year-old buried silty soil (3.3% organic C) these were undetectable. With more extensive data than those given in Table II it was possible to conclude that in all three types (permafrost, stored desert, and air-dried) urease activity more closely reflected the organic matter and not necessarily the microbial count. Such correlations with phosphatase activity were less certain.

During a period of 26 months of storage, a number of latosol clay soils showed changes in urease activity, generally a decrease, but one showed an increase of about 9 percent. Although no activity was found in two high salinity soils, activity was found in twelve other soils ranging in pH from 4.2 to 9.4.

Evidently soil urease in aged soils is not like jackbean urease (the first enzyme to be crystallized) in that no increase in activity was obtained

Table II. — Enzyme activities in soils.

Soil	Age	% organic C	Microbes ¹	P ²	U ²	D ²
Dublin	stored 12 years	2.8	2×10^6	1.4	1.2	0.003
Staten (muck)	fresh	24	2×10^7	0.3	0.5	—
Annanah (silt)	stored 6 years	1.1	8×10^6	0.1	0.08	0.002
Point Barrow	permafrost 9000 years	19	2×10^3	0.8	0.08	0.001
Hilgard (sandy)	stored 60 years	0.16	4×10^4	0.02	0.03	0
Hilgard (sandy)	stored 60 years	0.56	5×10^5	0.1	0.06	trace

¹ Microbes per gram soil. The number for the Point Barrow soil may be contamination.

² Activities in $\mu\text{M/g}$ soil/hr substrate reacting in tests for phosphatase (P), urease (U), and dehydrogenase (D) in samples of soil.

by adding cysteine. Jackbean urease is active only in the reduced state and one would expect that any SH-active forms in soil would be at least partially in an oxidized state (19).

The influence of electron-beam sterilization of soils on urease activity was variable: some showed an increase, an other a decrease. It is not clear as to whether irradiation leads to a release of some urease from dead soil organisms or to an increase of permeability of cell membranes to the substrate (19). The subject has been reviewed (5).

Our method of measuring urease activity reveals some activity in a Dublin clay loam at a relative humidity as low as 80 percent, which is below the humidity at which soil microbes can multiply readily. Since the relative humidity on Mars is less than one percent, one would not expect to find any enzyme activity or microbial growth unless water is localized, for example, at the edge of a melting ice pack (20).

PAULSON and KURTZ, in a heuristic work, measured the increase in urease activity and of numbers of ureolytic microorganisms in a soil following addition of ammonium sulfate and dextrose. Some of their data are replotted in Figure 1; if the lower urease activity curve is extrapolated to zero population a large ordinate of urease activity remains. After a maximum population has been reached (after about a day and a half) the population declines and so does the whole soil urease activity, as illustrated by the upper curve. Such data have been interpreted to mean that there is an extracellular background « noise level » of enzyme activity attributable either to urease adsorbed in and on the clay minerals or within the soil organic matter (16). Since adsorption on clays is not a serious impediment to the use of enzyme-proteins as food-stuffs by soil microbes, such as, e. g., by a *Pseudomonad* (8), adsorption cannot explain the persistence of urease-proteins in a soil as such a large fraction of measurable urease. Small amounts of soluble urease-active substances have been extracted from soil; e. g. Figure 2, (2) but by no means in amounts commensurate with total activity found in the soil. This leaves soil humus per se as the most likely carrier of the more stable fraction of soil urease activity, as represented by the intercept in Figure 1. This conclusion seems to have reached by CONRAD over 30 years ago (6).

Another method of extraction (4), Figure 2, successful in a special case (isolation of a tryptophan metabolizing enzyme), gave a product without urease activity but with a trace of tryptic activity (hydrolysing benzoylarginine amide). With these observations in mind we decided to try to extract a significant fraction of soil urease(s) with a combination of physical and chemical steps. Dublin clay-loam, air-dried, was suspend-

ed in phosphate buffer at 4°, pH 7, containing urea to break hydrogen in the humus, NaCl to reduce the enzyme denaturing effect of urea, EDTA to reduce cationic crosslinking within the humus and mercapto-ethanol to preserve a reduced state of any SH-urease present. Preliminary treatment of a soil suspension by ultrasonic vibration may give

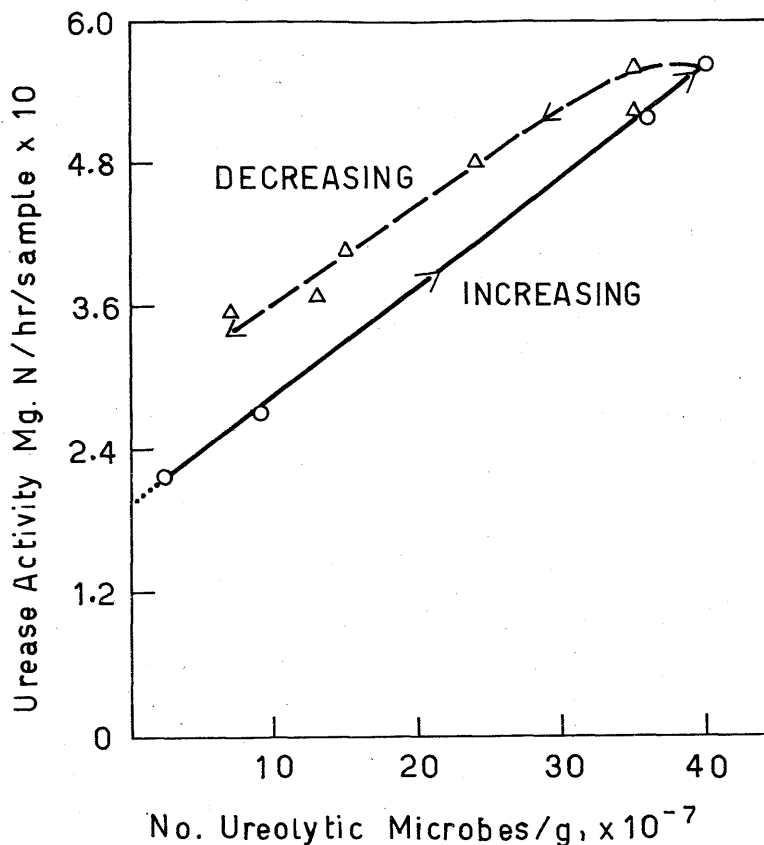


Fig. 1. — Trend in soil urease activity with population changes of ureolytic microorganisms in a Drummer silty clay loam. Adapted from Paulson and Kurtz (14).

better dispersion of the organic matter and chloroform may be added as a biostatic agent. The urea is eventually destroyed by the urease present in the extract.

After a few hours the treated suspension is filtered with the aid of a series of bacteriological, porous filter candles with decreasing pore size to remove microbes and clays. Following dialysis of the filtrate a dark brown precipitate appears. The non-filterable residue may be extracted

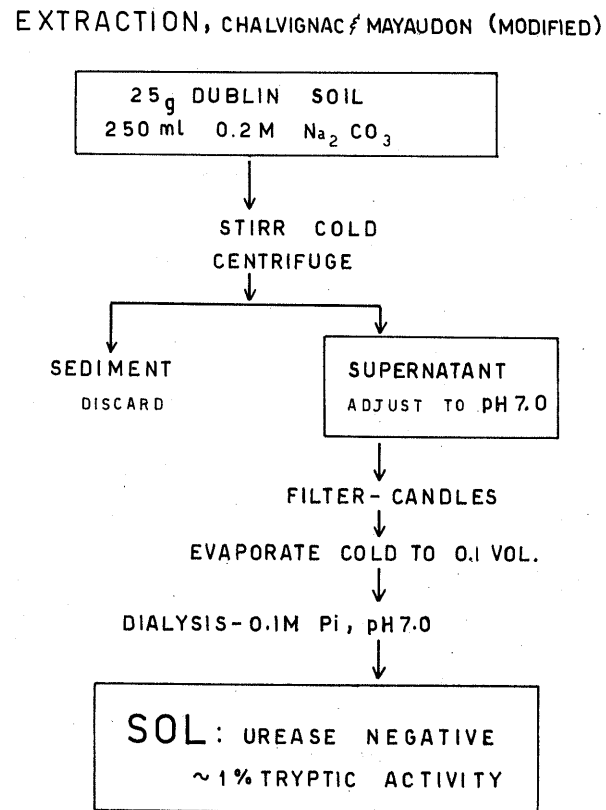
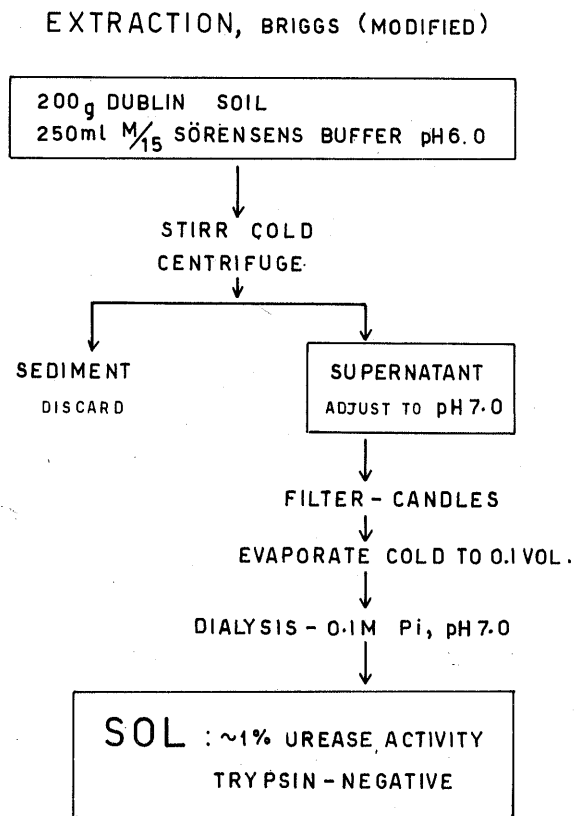


Fig. 2. — Application of the procedure of Briggs and Segal (1), left side, and of Chalvignac and Mayaudon (4), right side, to Dublin soil.

successively with phosphate solutions of increasing dilution and the additional extracts may be filtered and dialysed to increase the overall yield to between 20 and 40 percent of the original soil activity. By X-ray analysis these precipitates, after dialysis, were free of clays and accounted for over one third of the extracellular urease as estimated from plots of the kind shown in Figure 1. Urease activity in the precipitates was not destroyed by treatment with a broad spectrum mixture of proteolytic enzymes (Pronase). A similar statement may be made for urease activity in the soil per se, Table III (3).

Table III. — Resistance of dispersed soil urease to the action of Pronase, pH 7.

Mixture	4M NH ₃ liberated/hr from urea after incubation with pronase
a) precipitate alone 40 mg	1.5
b) precipitate + pronase 40 mg 0.5 mg	2.0
c) precipitate + pronase 40 mg 0.5 mg	0.4 (no urea present)
b) - c)	1.6
d) soil alone	0.3
e) soil + pronase 1 g 0.5 mg	0.6
f) soil + pronase 1 g 0.5 mg	0.3 (no urea present)
e) - f)	0.3

A modification of the original method of Burns et al. is shown in Figure 3. By dialysis of supernatant solutions against EDTA a urease-active sol is obtained instead of an active precipitate (PPT).

It may be safely concluded that soil urease(s) resides in organic colloidal particles with pores large enough for water, urea, ammonium and CO₂ to diffuse but the pores are too small to allow entry of proteolytic enzymes of microbial origin.

This enzyme-active organic matter, i. e. extracted humus, representing such a large fraction of the soil organic carbon, should be a favorable material for general research. Since it retains active enzymes it must be more nearly representative of soil organic matter in situ than are « humic acids » of old.

EXTRACTION OF HUMUS - BURNS METHOD

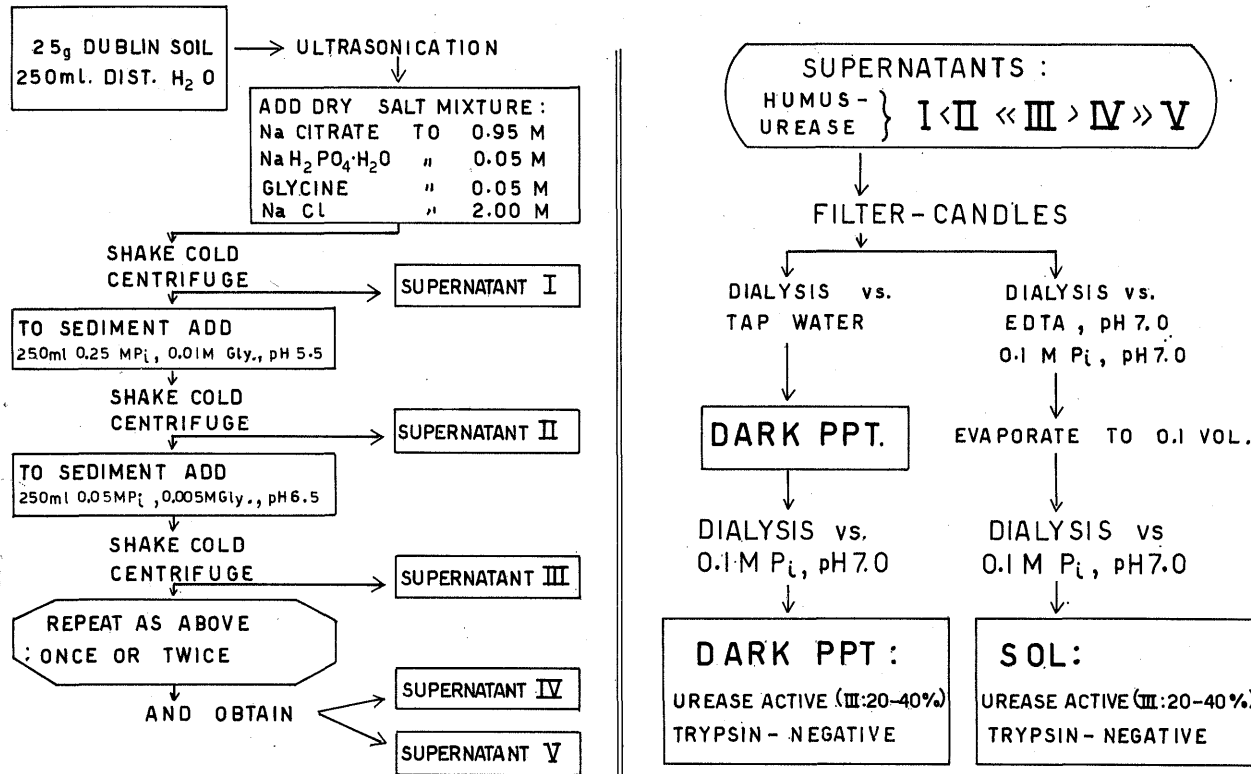
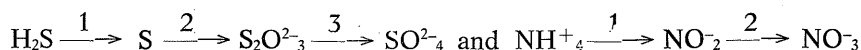


Fig. 3. — Application of the procedure of Burns et al. (3) to Dublin soil for extraction of organic matter high in urease activity.

Incidentally, a mixture of jackbean urease-bentonite lignin is also resistant to Pronase but adsorption of the enzyme on bentonite does not impart such protection (8).

The next important point of discussion is the question what becomes of the ammonia liberated from the urea. Ammonia nitrogen is oxidized by a series of consecutive biochemical reactions in soil.

Typically, in a laboratory experiment in soil microbiology, both nutrients and excreted products of metabolism and organisms are mixed in space. The system may be open to air but is closed to non-volatile substances. In soil in situ, however, there is a translocation of nutrients and products such that organisms at a lower level do not experience a composition of solutes identical with that to which organisms are exposed; at more shallow depths. This applies to series such as



Since these reactions take place in a downward direction in soil; i. e., both as functions of time and direction (down) we have a « *chimica senso unico* ».

Using nitrogen as an example, we may write

$$d(\text{NH}_4^+)/dt \quad \text{and} \quad d(\text{NO}_2^-)/dt$$

for changes in concentrations with time at any depth in soil. Differentiation of concentrations with respect to depth, however, gives vector quantities $d(\text{NH}_4^+)/dX$ and $d(\text{NO}_2^-)/dX$ (17). At the surface of a soil washed free from soluble nitrogen compounds and to which ammonium is applied, microbes will find to nitrite or nitrate. Microbes at a lower level will be bathed by all three ions in amounts that depend on reaction rates above them and on time required to transport reactants and products to that depth (fig. 4).

The rate of oxidation of a nutrient in a given soil volume element (the niche) at a depth X from the surface depends upon the number of cells or biomass. For autotrophic nitrifiers inorganic nitrogen acts as a substrate for growth *per se* and as a source of energy for growth and maintenance. The overall rate of consumption of ammonium for example can be described by

$$-\frac{d(\text{NH}_4^+)}{dt} = (A_1 + B_1) \gamma_1 m_1 + \alpha_1 m_1 + k^1_1 m_1 \quad (1)$$

where (NH_4^+) is substrate concentration, m_1 is biomass, A_1 is N oxidized for energy for cell growth per unit weight of biomass synthesized, B_1 is the amount of ammonium nitrogen incorporated in cells per unit weight of biomass synthesized, γ_1 is the specific growth rate ($\gamma_1 = d(\ln m_1)/dt$),

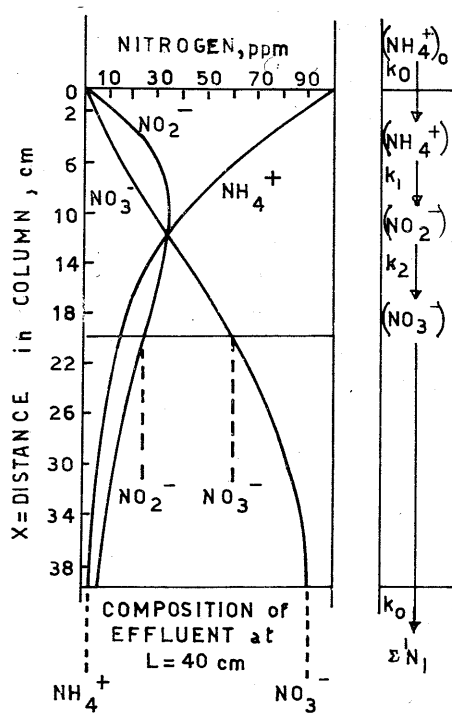


Fig. 4. — Continuous flow of nitrogen in a packed column. k_0 is the rate of inflow of ammonium, and k_1 and k_2 are the specific reaction rates for the chemical oxidations shown at the side of figure. For a steady state of flow, k_0 is also the exit flow rate. $\Sigma^1 N_i$ is the sum of all form of nitrogen in the effluent and equals $[\text{NH}_4^+]_0$ in the steady state, at which the population is at a maximum, and nitrogen is no longer being retained by the biomass. The composition of solutions at efflux are indicated by vertical dashed lines for columns of total lengths $L = 20$ cm and $L = 40$ cm. Note that the near coincidence of concentrations of NO_2^- , NO_3^- , and NH_4^+ at $X = 11,6$ cm is a coincidence for the values of γ_1 and γ_2 chosen and is not general. Also, the reaction is assumed to be at about pH 7, at which $(\text{NH}_4^+) > (\text{NH}_3)$. From McLaren (10).

α_1 is the N oxidized per unit weight per unit time for maintenance and k'_1 is the N oxidized per unit weight of biomass and time in ways that do not lead to growth and maintenance (12).

The last term, $k'_1 m_1$, can include oxidation of nitrogen accompanied by heat production and by the synthesis of intracellular polymers such as glycogen, polyphosphate and polyhydroxy butyrate (21), and presumably of extracellular mucus (22).

According to FORREST and WALKER (9) maintenance requirement is

insignificant compared to energy required for growth, and the results of ERH et al. (7) and others clearly show that the $k'_1 m_1$ term is overwhelmingly greater than the $B_1 \gamma_1 m_1$ term. In other words to a close approximation, if one is interested in following the conversions of nitrogen from a biogeochemical point of view as during nitrification and traslocation of nitrogen in soil, a good approximation is given by

$$-d(\text{NH}^+{}_4)/dt = (A_1 \gamma_1 + \alpha_1 + k_1) m_1 \quad (2)$$

In a sense NO^-_2 is a waste product for all of these but only the last term of equation (1) represents wasted metabolism. (The subscript 1 indicates the reaction $\text{NH}^+{}_4 \rightarrow \text{NO}^-_2$ is involved). Since oxidations of $\text{NH}^+{}_4$ or NO^-_2 are enzymatic, and based on growth studies generally (12, 15), γ_1 may be set equal to $\frac{\gamma_\infty (S)}{K_g + (S)}$, α_1 may be set equal to $\frac{\alpha_\infty (S)}{K_a + (S)}$ and $k'_1 = \frac{k''_1 \beta_1 (S)}{K_m + (S)}$ where S is substrate and γ_∞ , α_∞ and k''_1 are the maximum values obtainable (12). Here β_1 is the amount of enzyme per unit biomass, k''_1 is a proportionality constant and K_g , K_a and K_m are saturation constants. The K constants will be considered as equal in so far as the enzyme system is common to reaction represented by the three terms. The relative values of $A_1 \gamma_1$, α_1 , and k''_1 are not generally known but the ratio $k''_1 / (A_1 \gamma_1 + \alpha_1)$ may be large for lack of an energy coupling agent (such as phosphate limitation) (9) or for a coupling failure of CO_2 : $(A_1 + B_1) dm/dt = 0$. (N. WALKER, private communication).

With the above expression for γ_1 and k''_1 equation (2) becomes

$$\begin{aligned} -d(\text{NH}^+{}_4)/dt &= \frac{(\text{NH}^+{}_4) m_1}{K_{m_1} + (\text{NH}^+{}_4)} (A_1 \gamma_\infty + \alpha_\infty + k''_1 \beta_1) = \\ &= \frac{k_1 m_1 (\text{NH}^+{}_4)}{K_{m_1} + (\text{NH}^+{}_4)} \end{aligned} \quad (3)$$

where k_1 is the sum of constants. This form of equation (1) can be used to construct a model for the variation of concentrations of nitrification intermediates with depth in a soil column.

By analogy with equation (3) we can write an equation for oxidation of nitrite if this is the only form of inorganic nitrogen supplied, namely

$$-d(\text{NO}^-_2)/dt = \frac{k_2 m_2 (\text{NO}^-_2)}{K_{m_2} + (\text{NO}^-_2)} \quad (4)$$

where the subscript 2 applies to the second oxidation step. If a column of soil is perfused with a solution of nitrite for a few days the population m_2 can increase to a maximum and $m_2 = m_{\max_2}$; we define $k'_2 = K_2 m_{\max_2}$. (Of course, when this is true $A_2 \gamma_\infty \neq d(\ln m_2)/dt = 0$). This population is not necessarily the ultimate maximum population: the greatest population reached may be limited by the steady state, entering concentration $(NO_2)_o$ supplied to the column, be it optimum or less (or in excess with attendant toxicity), by some other limiting nutrient, or if all of these are optimal by spacial considerations (13).

The integral form of equation (4) is

$$(NO_2) = K_{m_2} \ln \frac{(NO_2)_o}{(NO_2)} + (NO_2)_o - k'_2 t \quad (4 a)$$

Replacing t by X/tk_o , and ignoring hydrodynamic dispersion, as a first approximation, we have

$$(NO_2) = K_m \ln \frac{(NO_2)_o}{(NO_2)} + (NO_2)_o - K_2 X \quad (4 b)$$

where $K_2 = k'_2/\epsilon k_o$; k_o is the entering flow rate of nitrite; ϵk_o is the rate of flow in the column, and ϵ is a proportionality constant.

The data in Figure 5 show how nitrite is oxidized in a column X cm in length and containing a maximum population of about 10^5 nitrifiers per cc in the upper 12 cm of a mixture of 90% sand and 10% of a Hanford fine sandy loam. $(NO_2)_o$ was chosen as 100 ppm nitrite and results with flow rates of 0,36 and 0,73 cm/hr are shown. The lines were calculated from equation (4 b) with $K_m = 16$ ppm.

The population of nitrifiers was perhaps only one tenth as great below 12 cm which account for the failure of nitrite to fall below a few ppm. The value of K_m for either flow rate falls within the expected range of reported values (12) and the ratio of K_2 for the slower influx to that for the faster is 1,8 as compared to the expected ratio of $0,73/0,36 = 2$.

Data are not yet available for ammonium profiles to be obtained in the same way, or for the consecutive reactions 1 and 2, but some predictions are available on how such profiles for consecutive reactions should appear (12). Some thought has also been given to competition of nitrifiers for the same niche (13) and to the vector analysis of system growing populations (11).

I hope that this discussion will suffice as telling you about some of our work at Berkeley (supported by both N.A.S.A. and the Kearney Foundation of Soil Science) and I hope we shall meet again. Thank you.

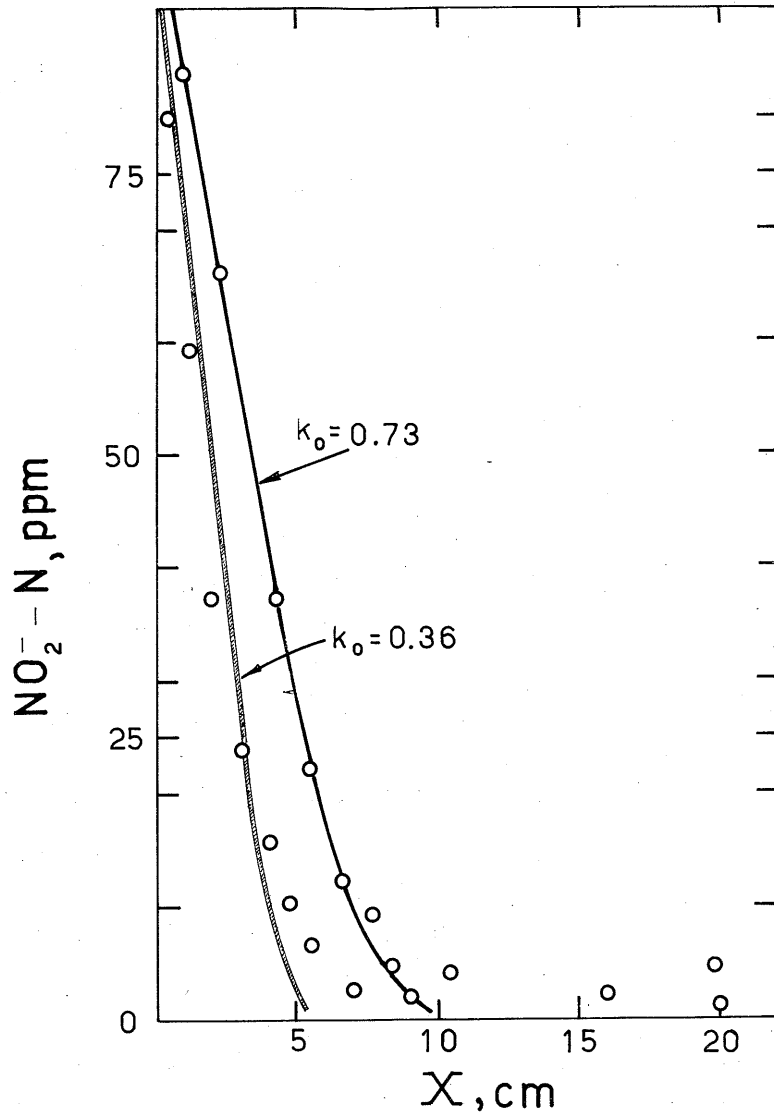
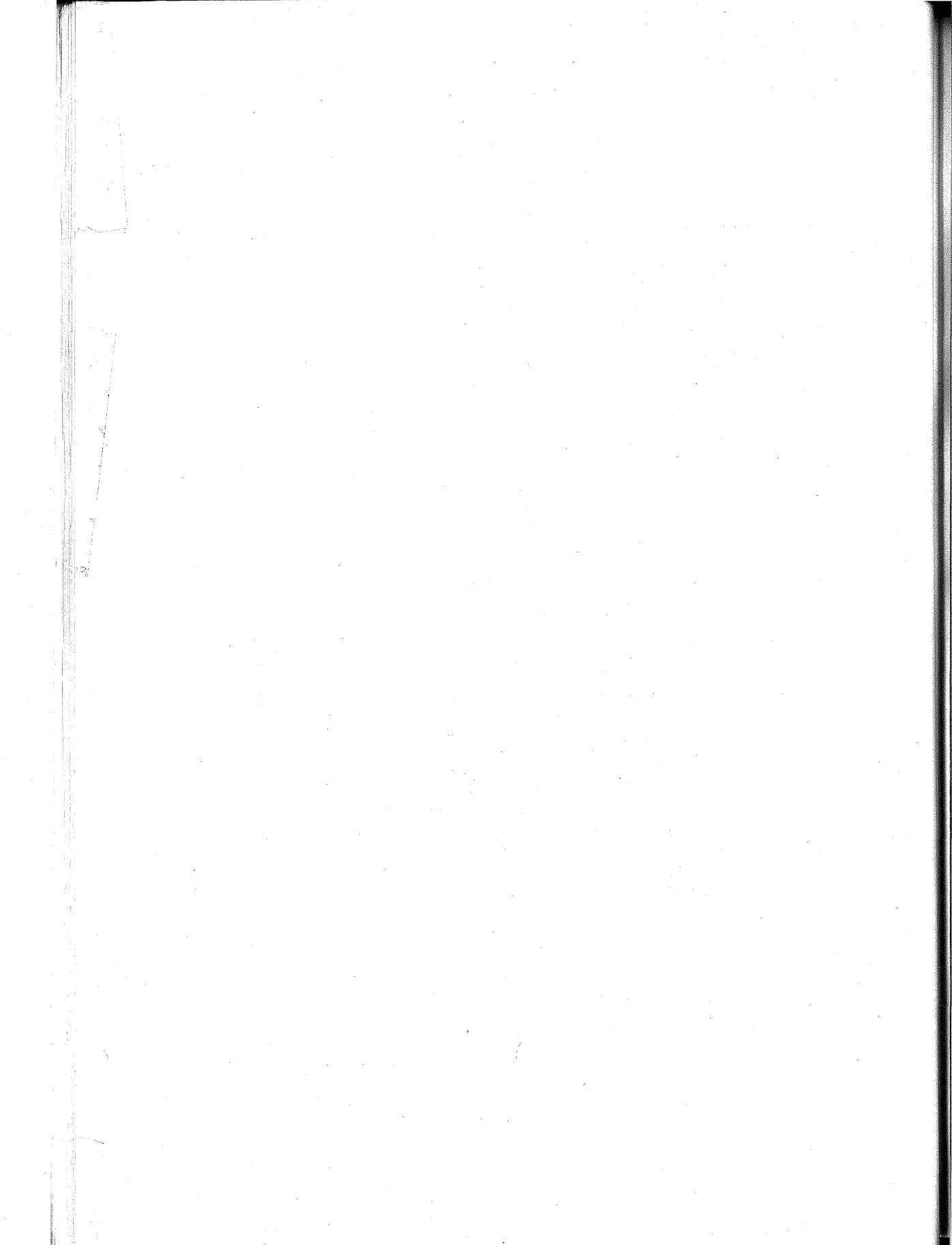


Fig. 5. — Influence of two flow rates on nitrification in a sandy soil column. Solid lines are plots of equation (4b). The cross section of the column was 82 cm²; the column was sampled during flow by withdrawing small volumes of liquid at the depths indicated by the points shown as circles and dots.

REFERENCES

- 1) BRIGGS M.H. and L. SEGAL — *Preparation and properties of a free soil enzyme*. Life Sciences 2 (1). (1962).
- 2) BRIGGS M.H. and D.J. SPEDDING — *Soil enzymes*. Science Progress 51: 217 (1963).
- 3) BURNS R.G., EL-SAYED M.H. and McLAREN A.D. — *Extraction of an urease-active organo-complex from soil*. Soil. Biol. Biochem., 4: 107 (1972).
- 4) CHALVIGNAC M.A. and MAYAUDON J. — *Extraction and study of soil enzymes metabolizing tryptophan*. Plant and Soil, 34: 25 (1971).
- 5) CAWSE P. — In: Soil Biochemistry. Vol. 3 (E.A. Paul and A.D. McLaren, Eds.) Marcel Dekker, New York, 1973 (in press).
- 6) CONRAD J.P. — *The nature of the catalyst causing the hydrolysis of urea in soils*. Soil Sci., 50: 119 (1940).
- 7) ERH K.T., D.E. ELRICH, R.L. THOMAS and C. T. CORKE — *Dynamics of nitrification in soils using a miscible displacement technique*. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 31: 585 (1967).
- 8) ESTERMANN E.F. and A.D. McLAREN — *Stimulation of bacterial proteolysis by adsorbents*. J. Soil Sci., 10: 64-78 (1959).
- 9) FORREST W.W. and D.J. WALKER — *The generation and utilization of energy during growth*. Adv. Microbial Physiology, 5: 213 (1971).
- 10) McLAREN A.D. — *Steady State Studies of nitrification in soil: theoretical considerations*. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 33: 273 (1969).
- 11) McLAREN A.D. — *Nitrification in soil: System approaching a steady state*. Soil Sci. Amer. Proc., 33: 551 (1969).
- 12) McLAREN A.D. — *Temporal and vectorial reactions of nitrogen in soil*. Can. J. Soil. Sci., 50: 97 (1970).
- 13) McLAREN A.D. and M.S. ARDAKANI — *Competition between species during nitrification in soil*. Soil Sci. Soc. Proc., 36: 602 (1972).
- 14) PAULSON K.N. and L.T. KURTZ — *Locus of urease activity in soil*. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 33: 897 (1969).
- 15) POWELL E.O., C.G.T. EVANS, R.E. STRANGE and D.W. TEMPEST — *Microbial physiology and continuous culture*. Her Majesty's Stationery Office, London, pp. 34-35 (1967).
- 16) RAMIREZ-MARTINEZ J.R. and A.D. McLAREN — *Some factors influencing the determination of phosphatase activity in native soils and in soils sterilized by irradiation*. Enzymologia, 31: 23 (1966).
- 17) ROSE C.W. — *Agricultural Physics*. Pergamon Press, Oxford, p. 125 (1966).
- 18) SKUJINS J.J. and A.D. McLAREN — *Persistence of enzymatic activities in stored and geologically preserved soils*. Enzymologia, 34: 213 (1968).
- 19) SKUJINS J.J. and A.D. McLAREN — *Assay of urease activity using ¹⁴C-urea in stored, geologically preserved, and in irradiated soils*. Soil Biol. Biochem., 1: 89 (1969).
- 20) SKUJINS J.J. and A.D. McLAREN — *Urease reaction rates at low water activity*. Space Life Sciences, 3: 3-11 (1971).
- 21) VAN GOOL A.P., P.P. TOBBACK and I. FISCHER — *Autotrophic growth and synthesis of reserve polymers in Nitrobacter winogradskyi*. Arch. Mikrobiol, 76: 252 (1971).
- 22) WINOGRADSKY S. — *Microbiologie du Sol*. Masson et Cie. Paris, 1949.



GIOVANNI PICCI

FITOTOSSINE E MICRORGANISMI DELLA RIZOSFERA

INTRODUZIONE.

La flora microbica terricola costituisce un fattore determinante nel « metabolismo » delle fitotossine nel suolo, analogamente a quanto succede per tutte quelle sostanze sulle quali si estrinsecano le azioni microbiche. Gli effetti di tale metabolismo hanno le loro ripercussioni sulla pianta e conseguentemente una trattazione sulle azioni microbiche sulle fitotossine — qualunque origine esse abbiano — trova la sua giusta collocazione nel più ampio argomento dei rapporti pianta-microrganismi (*).

La provenienza delle fitotossine nel suolo può essere così schematizzata:

A) Dalla pianta

- da escrezioni di radici intatte
- da residui vegetali (radici escisse, semi, frutti e foglie).

B) Dai microrganismi

- per via *diretta* (marasmine)
- per via *indiretta* (prodotte da azioni microbiche sui residui vegetali in decomposizione).

(*) Nella presente trattazione il termine *fitotossine* viene adoperato nel senso di WHEELER e LUKE (1963). Secondo tali AA. per fitotossina deve intendersi qualsiasi sostanza, prodotta da organismi viventi, che sia tossica per la pianta. Sono pertanto da considerarsi fitotossine quelle sostanze ad azione fitotossica prodotte dalla pianta — allelopatica — (RADEMACHER, 1957) e dai microrganismi — marasmine — (GAUMANN e JAAG, 1946). Stando alla classificazione proposta da GRANITI (1972), avremmo dovuto parlare, quasi esclusivamente di *fitoaggressine*. A nostro modesto avviso, per quanto pienamente concordi su di una terminologia il più esatta possibile, può essere valido adoperare il termine fitotossine in senso più ampio, una volta precisato il significato.

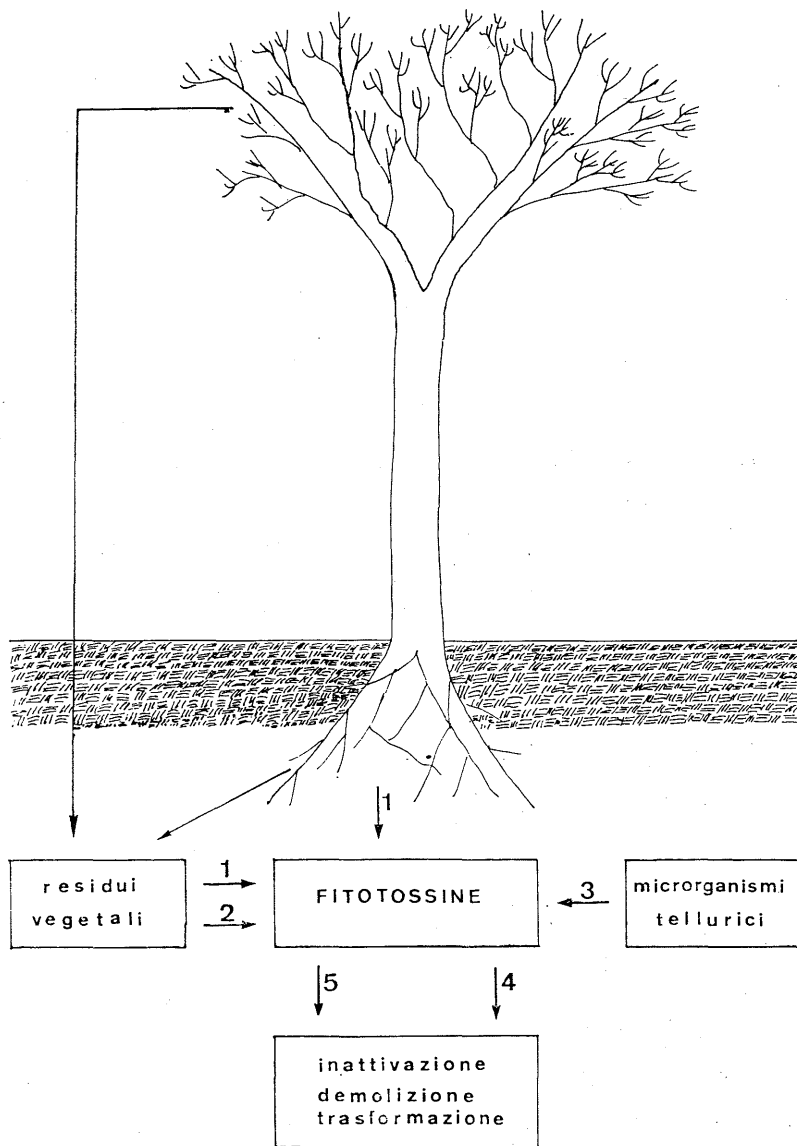


Fig. 1 - Origine e demolizione delle fitotossine nel suolo. 1: escrezione delle fitotossine; 2: liberazione delle fitotossine; 3: produzione di fitotossine; 4 e 5: demolizione delle fitotossine per via abiologica e biologica.

Le azioni demolitive o inattivanti esercitate sulle fitotossine possono essere:

A) Abiologiche (non trattate in questa sede)

B) Biologiche

- azioni microbiche sulle fitotossine prodotte dalla pianta
- azioni microbiche sulle fitotossine prodotte dai microrganismi.

Per quanto lo schema sopra riportato possa essere valido, in pratica risulta assai arduo stabilire quali fitotossine siano originate da escrezioni radicali, quali la decomposizione dei residui vegetali ed infine quali dai microrganismi direttamente (PATRICK, TOUSSON e KOCH, 1964).

Proprio a causa di queste difficoltà, alcuni ricercatori che hanno studiato l'argomento non hanno precisato la provenienza delle fitotossine, limitandosi a parlare di « prodotti metabolici di piante superiori », mentre altri hanno lavorato con estratti grezzi di suolo includendo in essi, pertanto, tutte le eventuali fitotossine presenti, prescindendo dalla loro provenienza.

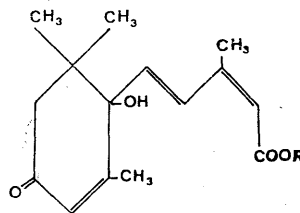
SOSTANZE FITOTOSSICHE PRESENTI NELLA PIANTA.

Prima di trattare dell'origine delle fitotossine nel suolo, nonché delle interazioni microrganismi-fitotossine, riteniamo opportuno passare in breve rassegna le principali sostanze di natura fitotossica reperibili nelle piante, raggruppandole secondo la loro natura chimica.

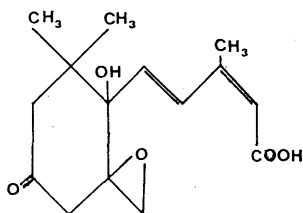
Terpeni e terpenoidi. - Nel 1963 fu isolata da giovani piante di cotone una sostanza denominata prima *abscissina II* e successivamente *acido abscissico* (ABA). Come è ormai ben noto, tale sostanza induce defoliazione e dormienza (ADDICOTT e LYON, 1969; WARENING e RYBACK, 1970). L'acido abscissico si trova anche sotto forma di glucoside.

Acido abscissico

(*) Abscissil- β -D-glucopiranoside
(R=glucosio)

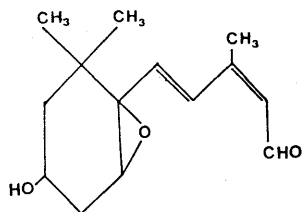


Un analogo dell'acido abscissico, dotato anch'esso di attività biologica, è l'acido faseico, isolato da *Phaseolus multiflorus* (MACMILLAN e PRYCE, 1968).



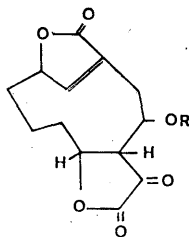
Acido faseico

Da *Phaseolus vulgaris* e da *Triticum vulgare* è stato estratto un altro analogo dell'acido abscissico, ad azione inibente, e costituito a sua volta da due sostanze, una delle quali altamente attiva e denominata xantosina (TAYLOR e BURDEN, 1970).

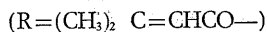


Xantosina

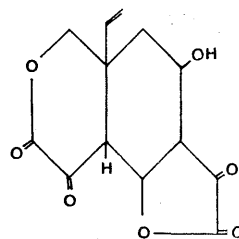
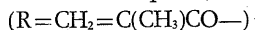
Da foglie di *Helianthus tuberosus* è stato isolato un sesquiterpene lattone: *eliangina* (MORIMOTO, SANNO e OSHIO, 1966). Sesquiterpeni di lattoni, sempre ad azione inibente, sono stati reperiti in *Elephantopus elatus* e denominati *elefantina* ed *elefantopina* e da *Veronia hymenolepsis* è stata isolata la *vernolepina*.



Elefantina



Elefantopina

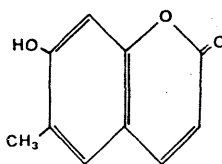


Vernolepina

Molte altre specie vegetali contengono terpenoidi i quali esercitano controllo allelopatico sull'accrescimento di diverse piante (EVENARI, 1961; GRÜMMER, 1961; MULLER, 1966; RICE, 1967; MULLER, 1970).

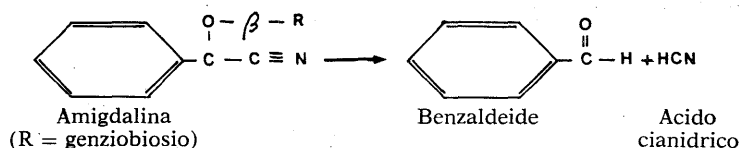
Lattoni. - In escrezioni radicali di avena sono state reperite *scopoletina*, *scopolina* (EBERHART, 1954, 1955) ed una terza sostanza, non identificata, e denominata semplicemente « glucoside degli apici radicali » (GOODWIN e POLLOCK, 1954).

Scopoletina
(7-idrossi-6-metossimarina)
Scopolina
(mono- β -glucopiranoside di scopoletina)



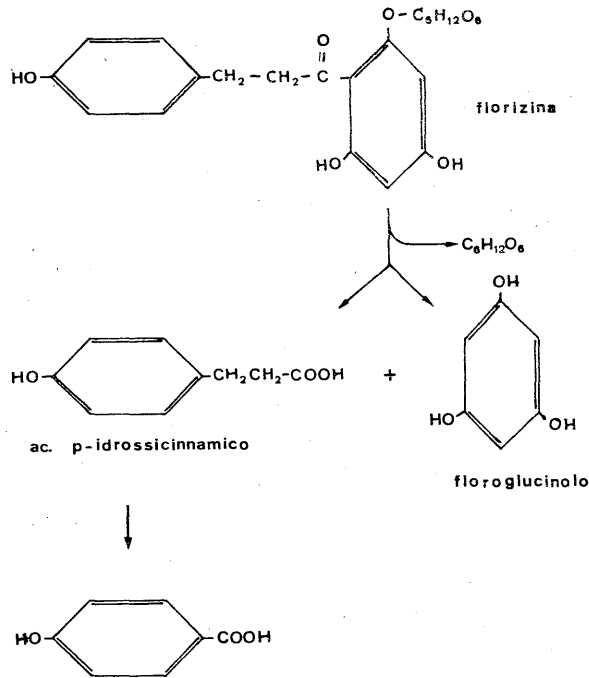
Le condizioni colturali dell'avena influiscono sulla quantità di scopoletina escreta, aumentando questa sensibilmente con il diminuire del nutrimento della pianta (MARTIN, 1956, 1957). La scopoletina e i relativi lattoni insaturi agiscono come inibitori di germinazione e di crescita (GOODWIN e TAVES, 1950; HAMER e Coll., 1951; MAYER ed EVENARI, 1952; AVERS e GOODWIN, 1956; POLLOCK e GREENE, 1954).

Glucosidi. - A parte la scopolina, alla quale abbiamo già accennato, e la calconaringenina che verrà trattata tra i composti fenolici, ricorderemo qui alcuni glucosidi i quali di per sé non sono fitotossici, ma sono resi tali a seguito di scissione del legame glucosidico. Vogliamo riferirci, ad esempio, all'*amigdalina* contenuta nei semi e negli essudati radicali di pesco (PATRICK, 1955; COPPOLA, PERCUOCO, ZOINA e PICCI, 1972), la quale, per azione microbica, si scinde in benzaldeide e acido cianidrico. È ormai da tempo dimostrata l'azione tossica della prima sostanza la quale produce inibizione della respirazione e imbrunimento degli apici radicali (SIGMUND, 1914, 1924).

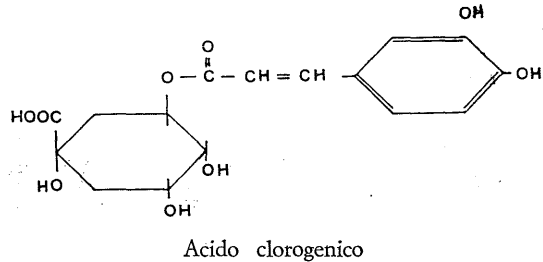
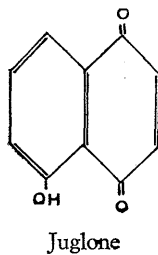


Alcune specie di Brassicacee contengono isotiocianati glucosidici, i quali, a seguito di idrolisi, danno luogo ad allilisotiocianato e β -fenetilisotiocianato che sono inibitori della crescita e della germinazione (ETTLINGER e KJARE, 1968).

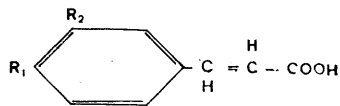
La *florizina*, rinvenuta nel melo (FASTABEND, 1955; SCHANDER, 1956) è un glucoside che dimostra azione fitotossica, „come ugualmente tossici sono alcuni suoi prodotti di idrolisi: *acido p-idrossicinnamico* e *acido p-idrossibenzoico*.



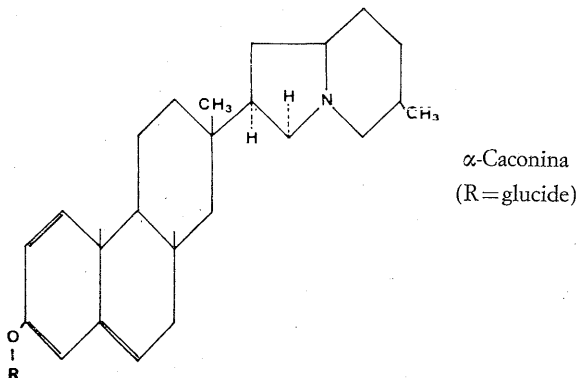
Fenoli. - Le sostanze di natura fenolica, naturalmente presenti nelle piante e aventi azione inibente, sono assai numerose. Tra queste più attivi si può annoverare lo *juglone* reperito in *Juglans nigra* (COOK, 1921; MASSEY, 1925; BODE, 1958; MORELAND e Coll., 1966). Ancora da ricordare sono gli acidi *clorogenico* (SONDHEIMER, 1964), *cinnamico*, *caffeico*, *cumarico*, *ferulico* (BÖRNER, 1960; SONDHEIMER, 1964; MORELAND, 1966), *calconaringenina-2-glucoside* (TURETSKAYA e Coll., 1968; KEFELI e Coll., 1969).



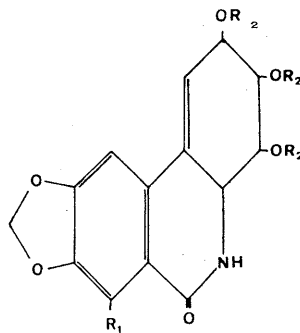
Acido trans-cinnamico ($R_1=R_2=H$)
 Acido trans-p-cumarico ($R_1=OH, R_2=H$)
 Acido trans-caffeico ($R_1=R_2=OH$)
 Acido trans-ferulico ($R_1=OH, R_2=OCH_3$)



Alcaloidi. - Potenti inibitori sono: α -caconina, isolata da foglie di specie di *Solanum* (KUHN e LÖW, 1954) e licoricidina e licoricinidolo, isolati da bulbi di *Lycoris radiata*. WALLER e BURSTRÖM (1969) hanno isolato da semi di *Delphinium ajacis* tre alcaloidi diterpenoidi, due dei quali sono risultati molto attivi nella loro azione inibente: *delcosina* e *LBA-III*.

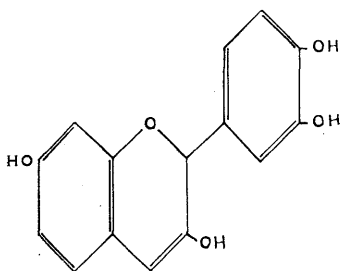


Licoricinidolo
($R_1=OH, R_2=H$)
 Licoricidina
($R_1=R_2=H$)

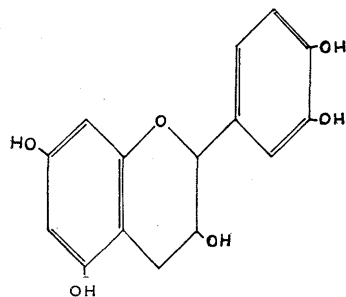


Tannini. - Sono, come è noto, molto diffusi nel regno vegetale (HATHAY, 1962; JURD, 1962). Almeno per alcuni di essi è stata dimostrata azione fitotossica, come ad esempio quella sostenuta dalle foglie di ginpro e dalla lettiera di tale pianta (JAMESSON, 1961, 1966, 1968, 1969, 1970). La ricordata azione tossica sarebbe attribuibile ad alcuni tannini condensati e precisamente a polimeri e monomeri di *leucoantocianidina* e *catechina*.

Recentissimamente sono stati reperiti negli estratti radicali di pesco e sono risultati dotati di azione fitotossica (COPPOLA e Coll., 1972).

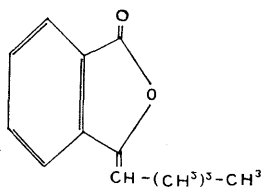


Leucoantocianidina

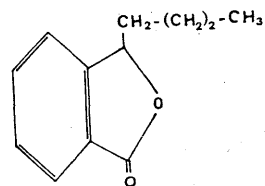


Catechina

Ftalidi. Alcuni composti ftalidici, inibenti la germinazione dei semi, sono stati reperiti in piante della famiglia delle Umbrellifere (MORELAND e Coll., 1966), come ad esempio *3-n-butilenesaidroftalide* e *3-n-butilesaidroftalide*.



3-n-butilenesaidroftalide



3-n-butilesaidroftalide

Aldeidi. Tra le aldeidi ad azione inibente si annoverano la *cinna-mica*, la *salicilica*, la *benzoica* (quest'ultima derivante — come abbiamo accennato — dalla scissione dell'amigdalina) ed altre (MORELAND, 1966 ed altri). Particolarmente attiva si è dimostrata la *3-acetil-6-metossibenzal-deide*, reperita nelle foglie di *Encelia farinosa* (WENT, 1942; GRAY e BÖRNER, 1948, 1948a).

ORIGINE DELLE FITOTOSSINE NEL TERRENO.

Le numerose sostanze di natura fitotossica, che come abbiamo ora visto si possono trovare nelle piante, pervengono nel terreno sia direttamente che indirettamente. Nel primo caso si tratta di *escrezione* dalle

radici, semi, frutti e foglie; nel secondo si tratta di *liberazione* delle fitotossine contenute nelle varie parti della pianta, parti che sotto forma di residui si trovano nel suolo e vengono decomposte (*).

I casi di escrezione veramente dimostrati (prescindendo dai riflessi ecologici che possono sussistere o meno) sono quelli riguardanti le seguenti sostanze fitotossiche:

- a) Dalle radici: scopoletine, scopolina, acido trans-cinnamico.
- b) Dai semi e frutti: sostanze fenoliche (esempio, acidi fenolico, p-cumarico, p-idrossibenzoico).
- c) Dalle foglie: acido abscissico e juglone.

La seconda modalità (indiretta) per mezzo della quale le fitotossine pervengono nel terreno si attua a seguito dell'intervento della flora microbica terricola. Infatti, come dicevamo poco fa, è proprio in conseguenza della decomposizione più o meno spinta dei residui vegetali, che da questi vengono liberati nel suolo i principi fitotossici eventualmente presenti nelle piante.

In passato si è molto discusso sulla eventualità che sostanze fitotossiche possano formarsi durante la decomposizione dei tessuti vegetali e molta letteratura si è accumulata sull'argomento, incluse esaurienti rassegne di sintesi (BONNER, 1950, 1960; MARTIN, 1957; McCALLA e HASKINS, 1964; PATRICK, TOUSSOUN e KOCH, 1964; PATRICK, 1971). Allo stato attuale delle nostre conoscenze sembra ormai dimostrabile la produzione di sostanze fitotossiche per tale via, una volta osservate determinate metodiche e inquadrato il problema dal punto di vista ecologico, o meglio microecologico. Senza dilungarci in particolari, basterà accennare che la detenzione di sostanze tossiche nelle radici in via di decomposizione sarà possibile se i detriti vegetali verranno liberati quasi completamente dalle particelle terrose aderenti, poiché le fitotossine si diffondono nel terreno dove vengono inattivate o adsorbite dai colloidi oppure sono degradate dalla flora microbica terricola. Tali metodiche,

(*) BÖRNER (1960) parla di *escrezione attiva* quando « la concentrazione (delle fitotossine) diviene sufficientemente elevata tanto da produrre un effetto diretto, nonostante la demolizione microbica e lo adsorbimento alle particelle del terreno ». Per *liberazione passiva* lo stesso BÖRNER (1960) intende invece un'escrezione a livello quantitativamente molto più basso. Da parte nostra, per *escrezione* intenderemo la fuoriuscita naturale di fitotossine, senza l'intervento di fattori esterni di natura demolitiva i quali, invece, consentono la *liberazione* di fitotossine eventualmente presenti nei tessuti vegetali.

perfettamente analoghe a quelle adoperate per dimostrare la presenza di antibiotici nel suolo (WRIGHT, 1954, 1956), hanno fornito risultati nettamente positivi (PATRICK, TOUSSOUN e SNYDER, 1963; PATRICK e TOUSSOUN, 1965; PATRICK, 1971).

Molte sono le condizioni che influiscono sulla quantità di tossine reperibili. Prescindendo per ora dalle azioni demolitive microbiche sulle quali riferiremo a parte, ricorderemo l'*età* della pianta dalla quale provengono i residui (piante giovani: minor quantità di fitotossine) e la *tensione di ossigeno* nel terreno, essendo l'anaerobiosi favorevole alla produzione di fitotossine. A quest'ultimo riguardo sarà però opportuna qualche precisazione. Considerando il problema dell'anaerobiosi dal punto di vista microecologico, sembra che nel terreno avvengano rapidamente fluttuazioni tra aerobiosi ed anaerobiosi in micro-aree localizzate (GREENWOOD, 1961, 1968; MC LAREN e SKUJINS, 1968); non solo, ma condizioni di anaerobiosi possono permanere a lungo nel suolo dopo periodi di pioggia o di irrigazione (CHAPMAN, 1965). Tutto questo rende possibile alte concentrazioni di fitotossine, sia pure a livelli di micro-ambienti, anche nei terreni normali e non soltanto in quelli asfittici (PATRICK, 1971).

Una volta fatte queste necessarie premesse di carattere generale, rimane da trattare delle specie dei residui vegetali produttori di fitotossine, nonché della natura chimica di queste.

Per quanto si riferisce alle specie vegetali, sono state dimostrate fitotossine nei residui più o meno decomposti delle seguenti piante: *Phleum pratense* (DORAN, 1928), riso mais e tabacco (PATRICK e KOCH, 1958), trifoglio rosso (GRIES, 1943), riso, orzo, *Phleum*, mais, grano, tabacco (PATRICK, TOUSSOUN e SNYDER, 1963).

Un cenno particolare merita, in questo contesto, la pratica della pacciamatura con paglia, la quale, mentre da un lato risulta efficace nel combattere l'erosione del suolo, dall'altra può dar luogo a fatti di tossicità nei confronti delle piante che seguono, a causa appunto di fitotossine che si riproducono (McCALLA e HASKINS, 1964; GUENZY e McCALLA, 1966).

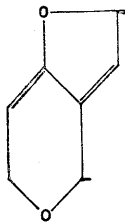
Per quanto si riferisce alla natura chimica delle sostanze fitotossiche trovate nei residui vegetali in via di decomposizione, GUENZY e McCALLA (1966) trovarono nei suoli pacciamati con paglia acido vanillico, p-idrossibenzoico, siringico, protocatecico e ferulico. Risultati analoghi di conferma sono riportati da BÖRNER (1960), WHITEHEAD (1963, 1964), TAKIJIMA (1963), WANG e Coll. (1967), ecc. TOUSSOUN e Coll. (1968) trovarono acido benzoico, fenilacetico, fenilpropionico e 4-fenilbutirrico.

Infine PATRICK (1971) trovò acido acetico, butirrico, benzoico, fenilacetico, idrocinnamico, 4-fenilbutirrico e ferulico.

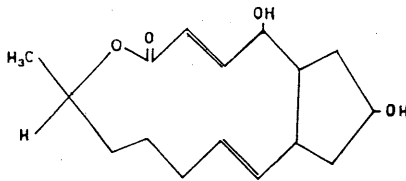
Finalmente, un'ultima sorgente di fitotossine nel suolo è costituita da una determinata flora microbica produttrice di sostanze dotate di azione fitotossica (marasmine, secondo GAÜMANN e JAAG, 1946).

Tra le specie microbiche interessate un ruolo assai importante spetta ai funghi e, tra questi, a molte specie del genere *Penicillium* come ad esempio: *P. expansum* Link (BARUM, 1924); *P. cyclopium* West., *P. nigricans* Thom, *P. paxilli* Bain, *P. janthinellum* Biour. (MIRCHINK, 1957), *P. thomii* Maire (CURTIS, 1957), *P. urticae* Bain (NORSTADT e Mc CALLA, 1963), *Penicillium* sp. (CATOVIC-CATTANI e PETERSON, 1964). Nell'ambito del genere *Aspergillus* è da ricordare *A. niger* (CURTIS, 1958a, b). Ricorderemo infine, tra gli altri microrganismi, specie di *Trichoderma* (MIRCHINK, 1957), *Cylindrocarpon radicolola* Wr. (EVANS e Coll., 1967) e *Pseudomonas fragi* Eigi. (MURAYAMA e Coll., 1969; MURAYAMA e TAMURA, 1970a, b).

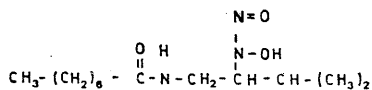
La natura chimica delle fitotossine prodotte dai microrganismi, per quel poco che ne sappiamo, è riportabile alle seguenti sostanze: *patulina*, prodotta da *Penicillium urticae* ed altri penicilli; *malformina* prodotta da *Aspergillus niger*; *brefeldina* da *Cylindrocarpon radicolola* e *Penicillium brefeldianum*; *fragina* da *Pseudomonas fragi* Eich.



Patulina



Brefeldina



Fragina

AZIONI MICROBICHE DEMOLITIVE SULLE FITOTOSSINE.

L'intervento microbico nei riguardi delle fitotossine non si limita ai due campi ora illustrati — e cioè alla liberazione di sostanze tossiche dai residui vegetali in decomposizione e alla produzione di maramine — ma lo stesso intervento microbico è chiamato in causa, come fattore preponderante, nei processi demolitivi o trasformativi delle fitotossine. In realtà ciò risulta del tutto naturale, poiché considerando il terreno come un qualche cosa di « vivente » è ovvio che esisterà un « metabolismo » anche delle fitotossine presenti nel suolo stesso.

Anche se la letteratura al riguardo è piuttosto scarsa, vi sono alcuni reperti che dimostrano — direttamente o meno — una componente microbiologica nella demolizione delle fitotossine.

Ad esempio, il *tempo* di permanenza dei residui vegetali nel suolo determina un graduale affievolimento della fotosicità di questi fino alla totale scomparsa di essa (PATRICK e Coll., 1958; PICCI e Coll., 1971). Ugualmente importante è il tempo che intercorre tra la raccolta dei campioni dei residui vegetali dal terreno e l'estrazione da essi di eventuali principi fitotossici, nel senso che il maggior effetto biologico si ottiene procedendo immediatamente all'estrazione (PATRICK e KOCH, 1958; PATRICK, TOUSSOUN e SNYDER, 1963). Anche l'*aereazione* è un fattore determinante, essendosi riscontrato un tenore ben maggiore di fitotossine nei suoli asfittici o sommersi (PATRICK e KOCH, 1958; BÖRNER, 1960; PATRICK, TOUSSOUN e SNYDER, 1963; PATRICK, TOUSSOUN e KOCH, 1964; PICCI e Coll., 1971).

Chiaramente dimostrata è l'azione disintossicante ad opera dei microrganismi nei riguardi delle fitotossine formatesi durante la sterilizzazione termica del terreno (ROVIRA e BOWEN, 1966).

Le seguenti sostanze ad azione fitotossica sono state osservate essere demolite o comunque inattivate dalla microflora tellurica: acido trans-cinnamico (BONNER, 1950); scopoletina (BONNER, 1946; EBERHARDT e MARTIN, 1957); 3-acetil-6-metossibenzaldeide (MULLER, 1953; MULLER e MULLER, 1956). Maggiori particolari sono reperibili per la cumarina. Sono state infatti identificate diverse specie microbiche capaci di utilizzare la cumarina come sorgente carboniata, quali ad esempio — tra gli Eumiceti — *Penicillium jenseni* e *P. nigricans* (BELLIS, 1958); *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. e *Fusarium solani* (SHIEH e BLACKWOOD, 1969). Tra gli schizomiceti degradatori di cumarina viene segnalato

Pseudomonas sp. (HALVORSON, 1961) e *Arthrobacter* sp. (LEVY, 1964 a). I prodotti di degradazione della cumarina, nel caso di attacco da *Arthrobacter* sp., sono acido o-cumarico e acido melilotico (LEVY, 1964 a); mentre in presenza di *Fusarium solani* la cumarina per idrogenazione è convertita a deidrossicumarina e questa, per idrolisi, ad acido melilotico (SHIEH e BLACKWOOD, 1969). Infine, con *Pseudomonas* sp. dalla cumarina si passerebbe ad acido melilotico e ad acido 2,3-diidrossifenilpropionico (HALVORSON, 1961).

L'acido o-cumarico viene ossidato, dalla microflora terricola, in acido p-idrossibenzoico il quale a sua volta, per debole ossidazione si trasforma in p-benzochinone.

Le fitotossine prodotte da *Penicillium funiculosum* sono più efficaci nei terreni sterili rispetto a quelli non sterili (CATTANI-CATOVIC e PETERSON, 1966). Gli estratti acquosi radicali di pesco mostrano la loro massima tossicità nel terreno sterile, mentre questa si attenua o scompare del tutto nel suolo non sterile (PICCI e Coll., 1971).

I tannini sono variamente decomposti dai microrganismi terricoli: più agevolmente quelli idrolizzabili, male quelli condensati. Le conoscenze sulla decomposizione dei primi sono abbastanza precise, sia riguardo agli agenti biologici, che ai prodotti formativi. È noto infatti che specie di *Aspergillus* e *Penicillium* sono implicate nella demolizione dei tannini idrolizzabili (FRIEDICH, 1956; COWLEY e WITTINGHAM, 1961; BEVERIDGE e HUGO, 1964; LIPPTSCH, 1961; LEWIS e STARKEY, 1968). Riguardo alla demolizione microbica dei tannini condensati le nostre conoscenze sono invece assai scarse. Ci risulta un lavoro di BOCADIA e Coll. (1960) i quali osservarono la decomposizione di catechina ad opera di *Penicillium solitum*, senza peraltro evidenziare composti intermedi. LEWIS e STARKEY (1969) osservarono ugualmente la demolizione di catechine da parte di *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium janthinellum* e *Fusarium* sp. Anche in questo caso non furono evidenziati prodotti intermedi, identificabili ad esempio con fluoroglucinolo o acido protocatetico, i quali si osservano come cataboliti nella demolizione della quercetina, sostanze di struttura assai simile alla catechina. La demolizione dei tannini, sia idrolizzabili che condensati, è stata osservata da COPPOLA e Coll. (1972).

Infine, rimarrebbe da considerare l'influenza che le fitotossine, sia escrete che liberate dalla pianta, esercitano sulla microflora tellurica ed in particolare su quella rizosferica. Purtroppo la letteratura al riguardo è molto esigua ed una ricerca organica in tal senso sarebbe desidera-

bile (*). Una cosa che sembra dimostrata è l'influenza stimolante che i prodotti di decomposizione dei residui vegetali nel suolo hanno sulla germinazione e sull'accrescimento dei funghi patogeni ad habitat terricolo. A seguito di tale stimolazione si può avere o incremento della malattia, qualora sia presente l'ospite specifico, o riduzione del numero dei fitopatogeni in assenza dell'ospite, in conseguenza della lisi dei propaguli fungini che rimangono inattivi nel terreno.

L'esistenza di un responso biologico dei funghi patogeni terricoli ai prodotti di decomposizione dei residui vegetali potrebbe costituire — secondo LINDEMAN (1970) — un nuovo capitolo di controllo biologico dei patogeni ad habitat terricolo.

Attualmente, a quanto ci risulta, è sconosciuta la natura chimica di tali sostanze attive sui funghi fitopatogeni; è invece accertata la provenienza che è appunto costituita dai residui vegetali in decomposizione. Sarebbe del tutto verosimile che almeno alcune sostanze che sono fitotossiche avessero nel contempo anche funzione di stimolo nei confronti di determinati funghi patogeni che si trovano nel terreno.

BIBLIOGRAFIA

- ADDICOT F.T. and J.L. LYON (1969) - *Physiology of abscisic acid and related substances*. Ann. Rev. Plant. Physiol., 20, 139.
- AVERS CH.J. and R.H. GOODWIN (1956) - *Studies on roots. IV. Effects of coumarin and scopoletin on the standard root-growth pattern of Pbleum pratense* Amer. Jour. Bot., 43, 612.
- BARUM C.C. (1924) - *The production of substances toxic to plants by Penicillium expansum* Link. Phytopathology, 14, 238.
- BELLIS D.M. (1958) - *Metabolism of coumarin and related compounds in culture of Penicillium species*. Nature, 182, 806.
- BEVERIDGE E.G. and W.B. HOUG (1964) - *The metabolism of gallic acid by Pseudomonas convexa*. Appl. Bacteriol., 27, 448.
- BOKADIA M.M., BROWN B.R. and G.A. SOMERFIELD (1960) - *The relative confymations of catechin and epicatechin*. Proc. Chem. Soc., 280.
- BODE H.R. (1958) - *Beiträge zur Kenntnis allelopatischer Erscheinungen bei einigen Jnglandaceen*. Plant, 51, 440.

(*) Naturalmente ci riferiamo alle fitotossine nel senso di WHEELER e LUKE (1963). Se invece includiamo nelle sostanze escluse o liberate dalla pianta anche gli antibiotici di origine vegetale (fitoncidi), i reperti sono molto numerosi e dimostrano l'azione inibente delle escrezioni vegetali sulla microflora rizosferica, con conseguente turbamento dei rapporti pianta-microrganismi.

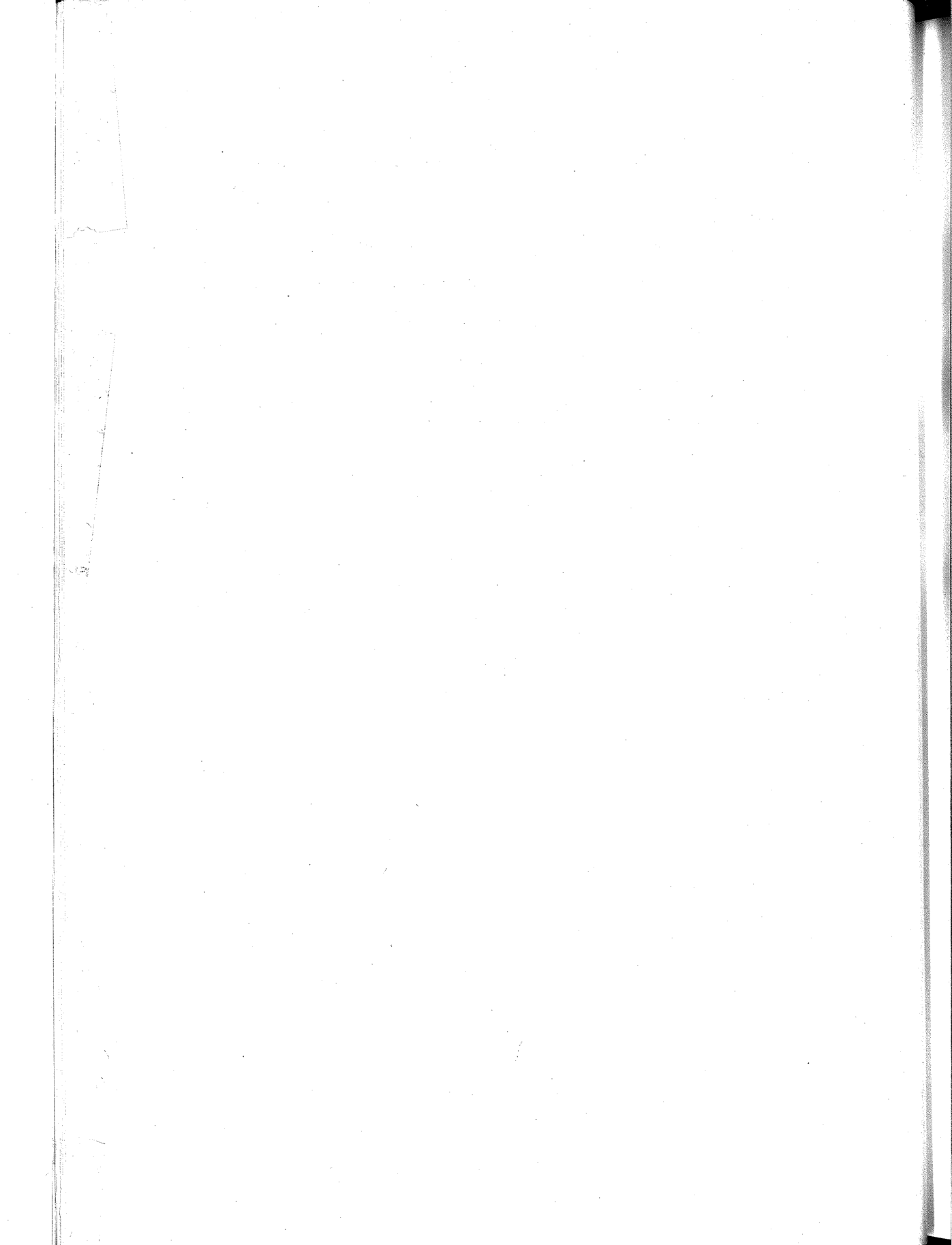
- BONNER J. (1946) - *Further investigation of toxic substances which from guayle: relation of toxic substances to the growth of guayle in sol.* Bot. Gaz., 107, 343.
- BÖRNER J. (1950) - *The role of toxic substances in the interaction of higher plants.* Botan. Rev., 16, 51.
- BÖRNER H. (1960) - *Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem.* Bot. Rev., 26, 393.
- CATOVIC-CATTANI S. and J.L. PETERSON (1964) - *Phytotoxicity of metabolic products of a Penicillium species to egyptian and maple.* Phytopathology, 54, 127.
- CATTANI-CATOVIC S. and J.L. PETERSON (1966) - *Phytotoxicity of the metabolites of a soil fungus: Penicillium funiculosum Thom.* Soil Sci., 101, 57.
- CHAPPMAN H.D. (1965) - *Chemical factors of the soil as they affect microorganisms.* In «*Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*». K.F. BAKER and W.C. SNYDER Univ. of California Press, Berkeley, pp. 120-141.
- COOK M.T. (1921) - *Wilting caused by walnut trees.* Phytopatol., 11, 346.
- COPPOLA S., PERCUOCO G., ZOINA A. e PICCI G. (1972) - *Aspetti microbiologici dei disturbi da reimpianto del pesco. II. Sostanze fitotossiche da estratti acquosi di radici di pesco e loro effetto sulla microflora terricola. Colloquio sui «Rapporti piante-microorganismi»* Pisa, Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo del CNR.
- COWLEY G.T. and W.F. WITTINGHAM (1961) - *The effect of tannin on the growth of selected soil microfungi in culture.* Mycologia, 53, 539.
- CURTIS R.W. (1957) - *Translocatable plant growth inhibitors produced by Penicillium thomii and Arachniotus trisporus.* Plant Physiol., 32, 56.
- CURTIS R.W. (1958a) - *Root curvatures induced by culture filtrates of Aspergillus niger.* Science, 128, 661.
- CURTIS R.W. (1958b) - *Curvatures and malformations in bean plant caused by culture filtrate of Aspergillus niger.* Plant Physiol., 33, 17.
- DORAN W.L. (1958) - *The growth of tobacco and brown root of tobacco as affected by timothy infusion of different ages.* J. Agr. Res., 36, 281.
- EBERHARDT F. (1954) - *Ausscheidung einer organischen Verbindung aus den Wurzeln des Hafers (Avena sativa L.).* Naturwiss. 41, 259.
- EBERHARDT F. (1955) - *Über fluoreszierende Verbindungen in der Wurzel des Hafers Ein Beitrag zum Problem der Wurzelansscheidungen.* Zeits. Bot., 43, 405.
- EBERHARDT F. und P. MARTIN (1957) - *Des Problem der Wurzelansscheidungen und seine Bedeutung für die gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen.* Zeit. Pflanzenkrankh.u. Pflanzenschutz 64, 193.
- ETTLINGEN M.G. and A. KJAER (1968) - *Sulfur compounds in plants.* Recent Ad. in Phytochem., 1, 59.
- EVANS G., CARTWRIGHT J.B. and N.H. WHITE (1967) - *The production of a phytotoxin, by some root-surface isolates of Cylindrocarpon radicola W.* Plant Soil, 26, 253.
- EVENARI M. (1949) - *Germination inhibitors.* Bot. Rev., 15, 153.
- FARTABEND H. (1956) - *Über die Ursachen der Bodenmudigkeit in Ostabaumschulen.* Landwirtschaft-Angewandte Wissenschaft, Sonderheft Gartenbau IV. Landwirtschaftsverlag Hilstrup Münster.
- FRIEDRICH H. (1956) - *Der Abbau von phenolischen Substanzen durch Aspergillus niger.* Arch. Microbiol., 25, 297.

- GAUMANN E. und O. JAAG (1946) - *Über das Problem der Welkekrankheiten bei Pflanze*. *Experientia*, 2, 215.
- GOODWIN R.H. and B.M. POLLOCK (1954) - *Studies on roots. I Properties and distribution of fluorescent constituents in Avena roots*. *Am. Jour. Bot.*, 41, 516.
- GOODWIN R.H. and C. TAVES (1950) - *The effect of coumarin derivatives on the growth of Avena roots*. *Am. Jour. Bot.*, 37, 224.
- GRANITI A. (1972) - *The evolution of the toxin concept in Plant Pathology*. In « *Phytotoxins in Plant Diseases* ». R.K.S. WOOD, A. BALLIO and A. GRANITI (ed.) Acad. Press. N.Y.
- GRAY R. and J. BÖRNER (1948) - *An inhibitor of plant growth from the leaves of Encelia farinosa*. *Amer. Jour. Bot.*, 35, 52.
- GREENWOOD D.J. (1961) - *The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil*. *Plant Soil*, 14, 360.
- GRIES G.A. (1943) - *The effect of plant decomposition products on root diseases* (Abstr.). *Phytopathology*, 33, 1111.
- GRÜMMER G. (1961) - *The role of toxic substances in the interrelationship between higher plants*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 15, 209.
- GUENZI W.D. and T.M. MCCALLA (1966) - *Phytotoxic substances extracted from soil*. *Soil Sci., Soc. Am. Proc.*, 30, 214.
- HALVORSON H. (1961) - *The metabolism of coumarin by a Pseudomonas sp.* Tesi per Ph. D., Department of Agricultural Bacteriology, MCGILL Univ., Montreal, Quebec.
- HAMER C.L., SELE H.M., KLONPAVENS W. and J.R. VAUGHN (1957) - *Selective inhibition of the growth of green plants and fungi by beta methyl umbelliferone*. *Bot. Gaz.*, 112, 135.
- HATHWAY D.E. (1962) - *The condensed tannins*. In « *Wood Extractives* ». W.E. HILLIS (ed.) pp. 191-228. Acad. Press, N.Y.
- JAMESON D.A. (1961) - *Growth inhibitors in native plants of northern Arizona*. U.S. Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Exp. Sta. Res. Note 61, 2 pp.
- JAMESON D.A. (1966) - *Pinyon-juniper litter inhibit growth of blue grama*. *J. Range Management*, 19, 214.
- JAMESON D.A. (1968) - *Species interactions of growth inhibitors in native plants of northern Arizona*. U.S. Forest Service Rocky Mountain Forest and Range Exp. Sta. Note RM-113, 2 pp.
- JAMESON D.A. 1970) - *Degradation and accumulation of inhibitory substances from Juniperus orteosperma* (Torr.) Little. *Plant and Soil*, 33, 213.
- JAMESON D.A. and J.D. DODD (1969) - *Herbage production differs with soil in pinyon-juniper test of Arizona*. U.S. Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Exp. Sta. Note RM-131, 4 pp.
- JURD L. (1962) - *The hydrolyzable tannin*. In « *Wood extractives* ». W.E. HILLES (ed.) pp. 229-260, Acad. Press, N.Y.
- KEFELI V.L., KOF E.M., KNIPL Y.A.S., BUKHANOVA L.V. and E.L. YARVISTE (1969) - *Conversion of isosalipurposide and phoridzin on contact with various plant tissues*. *Biochemistry*, 34, 719.
- KUHN R. und I. LÖW (1954) - *Die Konstitution des Solanis*. *Angew. Chem.*, 66, 639.
- LEVY C.C. (1964a) - *Metabolism of coumarin by a microorganism*. *Nature*, 202, 596.
- LEVY C.C. (1964b) - *Metabolism of coumarin by a microorganism: o-coumaric and nucleotic acid*. *Nature*, 204, 1059.

- LEWIS J.A. and R.L. STARKEY (1968) - *Vegetable tannins, their decomposition and effects on decomposition on some organic compounds*. Soil Sci., 106, 241.
- LEWIS J.A. and R.L. STARKEY (1969) - *Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms*. Soil Sci., 107, 235.
- LINDERMAN R.G. (1970) - *Plant residue decomposition products and their effects on short roots and fungi pathogenic to roots*. Phytopathology, 60, 19.
- LIPPITSCH M. (1961) - *Untersuchungen über Tannase bei Aspergillus niger*. Arch. Mikrobiol., 39, 209.
- MACMILLAN J. and R.J. PRICE (1968) - *Phaseic acid, a putative relative of abscisic acid, from seed of Phaseolus multiflorus*. Chem. Commun., n° 3, 124.
- MANEY A.B. (1925) - *Antagonism of the walnuts (Juglans nigra and J. cinerea L.) in certain plant association*. Phytopathol., 15, 773.
- MARTIN P. (1956) - *Qualitative und quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung organischer Verbindungen aus den Keimwurzeln des Hafers (Avena sativa L.)*. Naturw., 43, 227.
- MARTIN P. (1957) - *Die Abgabe von organischen Verbindungen, insbesondere von Scopoletin, aus den Keimwurzeln des Hafers*. Zeit. Bot., 45, 475.
- MARTIN H. (1957) - *Chemical aspects of ecology in relation to agriculture*. Can. Dept. Agr. Publ. 1015, 96.
- MAYER A.M. and M. EVENARI (1952) - *The relation between the structure of coumarin and its derivatives, and their activity as germination inhibitors*. Jour. Exp. Bot., 3, 246.
- MCCALLA T.M. and F.A. HASKINS (1964) - *Phytotoxic substances from soil microorganisms and crop residues*. Bacteriol. Rev., 28, 181.
- McLAREN A.D. and J. SKUJINS (1968) - *The physical environment of micro-organisms in Soil*. In «The Ecology of soil bacteria», T.R.G. Gray and D. Parkinson (ed.), University of Toronto Press, pp. 3-24.
- MIRCHINK T.G. (1957) - *On fungi causing toxicity of turfpodzol soil in various stages of cultivation*. Microbiology USSR, 26, 83.
- MORELAND D.E., H.G. EGLEY, A.D. WORSHAM and T.J. MONACO (1966) - *Regulation of plant growth by constituents from higher plants*. Advan. Chem. Ser., 53, 112.
- MORIMOTO H., Y. SANNO and H. OSHIO (1966) - *Chemical studies heliangine, a new sesquiterpene lactone isolated from the leaves of Helianthus tuberosus*. Tetrahedron, 22, 3173.
- MULLER C.H. (1966) - *The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition*. Bull. Torrey Bot. Club., 93, 332.
- MULLER C.H. (1970) - *Phytoxins as plant habitat variables*. Recent Adv. Phytochem., 3, 105.
- MULLER C.H. (1953) - *The association of desert annuals with shrubs*. Amer. Jour. Bot., 40, 53.
- MULLER W.H. and C.H. MULLER (1956) - *Association patterns involving desert plants that contain toxic products*. Amer. Jour. Bot., 43, 354.
- MURAYAMA A., R. HATA and S. TAMURA (1969) - *Eragin, a new biologically active metabolite of Pseudomonad*. I. Isolation, characterization and biological activities. Agr. Biol. Chem., 33, 1599.
- MURAYAMA A. und S. TAMURA (1970 a) - *Über Fragin, ein Neus Biologisch Aktives Stoffwechselproduct von Pseudomonas fragi*. II. Zur Struktur und Chemie des Fragius. Agr. Biol. Chem., 34, 122.

- MURAYAMA A. and S. TAMURA (1970 b) - *Fragin*, a new biologically active metabolite of a *Pseudomonas*. III. Synthesis of (I) *Fragin*. Agr. Biol. Chem., 34, 130.
- NORSTADT F.A. and T.M. MCCALLAA (1963) - A phytotoxic substance from a species of *Penicillium*. Science, 140, 410.
- PATRICK Z.A. (1955) - The peach replant in Ontario. II. Toxic substances from microbial decomposition products of peach root residues. Can. Jour. Bot., 33, 461.
- PATRICK Z.A. (1971) - Phytotoxic substances associated with the decomposition in soil of plant residues. Soil Science, 111, 13.
- PATRICK Z.A. and L.W. KOCH (1958) - Inhibition of respiration, germination and growth by substances during decomposition of certain plant residues in the soil. Can. J. Bot., 36, 621.
- PATRICK Z.A., T.A. TOUSSOUN and L.W. KOCH (1964) - Effect of crop-residue decomposition products on plant roots. Annu. Rev. Phytopathology, 2, 267.
- PATRICK Z.A., T.A. TOUSSOUN and W. SNYDER (1963) - Phytotoxic substances in arable soil associated with decomposition of plant residues. Phytopathology, 53, 152.
- PICCI G., S. COPPOLA, G. PERCUOCO e A. ZOINA (1971) - Aspetti microbiologici dei disturbi da reimpianto nel pesco. Agr. Italiana, 26, 266.
- POLLOCK B.M., R.H. GOODWIN and S. GREENE (1954) - Studies on roots. II. Effect of coumarin, scopoletin and other substances on growth. Amer. Jour. Bot., 41, 521.
- RODEMACHER B. (1957) - Die Dedeutung allelopatischer Erscheinungen in der Pflanzenpathologie. Zeit. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz, 64, 427.
- RICE E.L. (1967) - Chemical warfare between plants. Bios, 38, 67.
- ROVIRA A.D. and G.D. BOWEN (1966) - The effects of microorganisms upon plant growth. II. Decomposition of heat-sterilized soil by fungi and bacteria. Plant Soil, 25, 129.
- SCHANDER H. (1956) - Die Bodenmüdigkeit bei Obstgehölzen. Bayrischer Landwirtschaftsverlag, Bonn-München-Wien.
- SHIEH H.S. and A.C. BLACKWOOD (1969) - Use of coumarin by soil fungi. Can. J. Microb., 15, 647.
- SIGMUND W. (1914) - Über die Einwirkung von Stoffwechselprodukten auf die Pflanzen. II. Einwirkung N-freier pflanzlicher Stoffwechselprodukte auf die Keimung von Samen. (Glucoside, Gerbstoffe und ihre Spaltung-sprodukte). Biochem. Zeits, 62, 339.
- SIGMUND W. (1924) - Über die Einwirkung von Stoffwechsel-Endprodukten auf die Pflanzen. III. Einwirkung N-freier pflanzlicher Stoffwechsel-Endprodukte auf die Keimung von Samen: Äterische Öle, Terpene u.a. Biochem. Zeits, 146, 389.
- SONDHEIMER E. (1964) - Chlorogenic acids and related depsider. Bot. Rev., 30, 667.
- TAKIJIMA Y. (1963) - Studies on behaviour of growth-inhibiting substances in paddy soils with special reference to the occurrence of root damage in peaty paddy field. Bull. Nat. Inst. Agr. Sci. Tokyo, B., 13, 217.
- TAYLOR H.F. and R.S. BURDEN (1970) - Xantosin, a new naturally occurring plant growth inhibitor. Nature, 227, 302.
- TOUSSOUN T.A., A.R. WEINHOLD, R.G. LINDERMAN and Z.A. PATRICK (1968) - Nature of phytotoxic substances produced during plant residue decomposition in soil. Phytopathology, 58, 41.
- TURETSKAYA R., V. KEFELI, M. KUTACEK, R. VACKOVA, N.G. TSCHUMAKOVSKI and T. KRUPNIKOVA (1968) - Isolation and some physiological properties of natural plant growth inhibitors. Biol. Plant., 10, 205.

- WALLER G.R. and H. BURSTRÖN (1969) - *Diterpenoid alkaloids as plant growth inhibitors*. Nature (London), 222, 576.
- WANG T.S.C., T.K. YANG and T.T. CHUNG (1967) - *Soil phenolic acids as plant growth inhibitors*. Soil Sci., 103, 239.
- WARRING P.F. and G. RYBACK (1970) - *Abscissic acid: A new growth-regulating substance in plant*. Endeavour, 29, 84.
- WENT F.W. (1942) - *The dependence of certain annual plants on shrubs on Southern California deserts*. Bull. Torrey Bot., 69, 100.
- WHEELER H. and H.H. LUKE (1963) - *Microbial toxins in plant disease*. Ann. Rev. Microbiol., 17, 223.
- WHITEHEAD D.C. (1963) - *Some aspects of the influence of organic matter on soil fertility*. Soil Fertilizers, 26, 217.
- WHITEHEAD D.C. (1964) - *Identification of p-hydroxybenzoic, vanillic, p-coumaric and ferulic acids in soil*. Nature (London), 202, 417.



ISTITUTO RICERCHE ORTICOLE - MINOPRIO (Co)

GIULIO BANFI

EFFETTO RIZOSFERA NEL TERRENO ED IN IDROPONICHE

Tutte le attività microbiche che nel terreno gradualmente e più o meno rapidamente si evolvono trasferendosi dalla spermatosfera alla rizoplana ed alla rizosfera e si manifestano con maggiore e minore evidenza ai diversi livelli nell'ambito della edafosfera, vengono generalmente valutate in espressione numerica il cui indice R/S propone una comparazione quantitativa tra zone contigue di un medesimo substrato, essenzialmente differenziato dalla presenza o meno di un vegetale superiore. La interpretazione di tale indice che la letteratura e l'esperienza dimostrano, salvo eccezioni, superiore all'unità se riferito al terreno non rizosfera, è significativa e diviene attendibile, ma limitata alla evidenziazione ed alla valutazione dell'entità di un fenomeno. Il rapporto R/S indica, ma non chiarisce la natura ed il meccanismo degli intricati processi biologici che insorgono nell'ambito della rizosfera. Occorre pertanto che tale espressione numerica venga integrata da un esame approfondito che di questi fenomeni si sforzi di dare un'interpretazione altrettanto attendibile per l'aspetto qualitativo.

Si potrebbe però osservare che in batteriologia ed in particolare per il tema in questione l'uso delle espressioni « quantitativo e qualitativo » non è del tutto appropriato; in realtà i due termini offrono una differenziazione precisa, ma il loro impiego non può essere categorico, l'uno non esclude l'altro e sarebbe errore grossolano non considerare il concetto fondamentale di « rapporto » tra numero di microrganismi ed attività da essi esplicate.

Se per motivi imprescindibili di norme igieniche la commestibilità di un alimento o la potabilità di un'acqua possono e devono esprimersi in cifre, l'individuazione del grado di fertilità biologica di un terreno agrario, forestale o di qualsiasi tipo di substrato coltivabile non può contenersi entro limiti numerici definiti, ma richiede un esame ed una valutazione qualitativa e quantitativa di tutti gli elementi che concorrono alla

sua formazione. Per l'aspetto pratico ciò che interessa, nel complesso, non è tanto il numero assoluto di microrganismi appartenenti a questo od a quel gruppo funzionale, quanto la somma degli effetti cui porta l'attività globale in rapporto all'ambiente.

J. Pochon, P. Tardieux (1962), H. Girard e R. Rougeux (1967) si sono valsi delle tradizionali e pressoché insostituibili tecniche di Winoogradsky per conferire alla metodologia analitica una maggiore funzionalità nell'intento di completare e perfezionare le tecniche di conteggio in solido ed in liquido con i criteri di valutazione degli « indici di attività ». Così è per i diversi poteri: ammonificante, nitrificante, denitrificante ed altri. L'opportunità di applicare tali metodi allo studio della rizosfera va esaminato caso per caso in rapporto ai singoli gruppi funzionali, ma una valutazione complessiva e comparativa dei fenomeni biologici non può prescindere dall'evolversi dell'equilibrio dinamico di organizzazione e mineralizzazione proprio di cicli biologici interdipendenti che caratterizzano un substrato.

INTERAZIONE FRA PIANTA, SUBSTRATO, MICRORGANISMI

Nella rizosfera tipica di ogni essenza vegetale, sia essa spontanea o coltivata, i microrganismi sono fisiologicamente più attivi e più numerosi che nel terreno distante dalle radici; il numero delle specie vegetali e dei microrganismi studiati e citati per gli « effetti rizosfera » è talmente cospicuo che una vera e propria elencazione risulterebbe incompleta, ma soprattutto priva di senso se non correlata ai singoli risultati o per lo meno agli scopi specifici delle molteplici ricerche.

Dai lavori fondamentali di A. G. Lochead e F. E. Chase (1943), da quelli della numerosa schiera di Ricercatori citati nel trattato di Krasilnikov (1958), sino alle più recenti esperienze di N. Sethunathan (1970) sui rapporti tra regolatori di crescita ed « effetti rizosfera », di M. F. Kovacs jr. (1971) sulla composizione degli essudati in acidi aromatici ed alifatici, di A. C. Gaur e K. K. R. Bhardwaj (1971) e di A. Togwell Jackson (1971) sulla mobilizzazione dei fosfati e dei silicati di calcio nella rizosfera di cereali e di essenze forestali, la sperimentazione ha contribuito validamente ad armonizzare le finalità della ricerca pura con l'interesse agronomico.

L'ambiente nel quale gli « effetti rizosfera » possono manifestarsi è complesso poiché gli elementi ed i fattori che li condizionano non solamente sono numerosi, ma in evoluzione continua, tale sovente da sfug-

gire ad un diretto controllo. Pianta, terreno, microrganismi sono tre termini fondamentali del sistema la cui funzionalità è strettamente dipendente dalle condizioni di equilibrio dei loro rapporti ed è chiaramente comprensibile come tale equilibrio sia soggetto a perturbazioni naturali ed antropiche cui deve necessariamente o non necessariamente soggiacere.

Il terreno è un laboratorio di processi fisici, chimici e biologici in continue reazioni di scambio con i vegetali superiori da un lato e con la flora microbica dall'altro; la sua tipica funzione intermedia di substrato è senza dubbio preminente. L'entità e la natura di questa mediazione è caratterizzata da una serie di fattori numerosi che tuttavia possono agire anche direttamente sulla pianta e sui microrganismi.

Pertanto lo studio di tali interazioni assume un interesse agronomico particolare se considerato per gli « effetti rizosfera » quali ad esempio:

la modificazione della struttura e della composizione del terreno;

il controllo dei processi nutrizionali della pianta, dall'assorbimento radicale allo scambio metabolico con il substrato;

la salvaguardia dello stato di salute della pianta mediante il controllo degli agenti patogeni.

Le acquisizioni sino ad oggi raggiunte conducono ad una constatazione sicura che i rapporti tra vegetali superiori ed inferiori non sono accidentali nel terreno, come si potrebbe pensare nel caso di organismi saprofiti. La pianta influisce sullo sviluppo microbico, anche selettivamente e la flora microbica della rizosfera interviene a modificare più o meno direttamente le condizioni di vita della pianta stessa.

Come può influire la pianta? Dall'emissione della radichetta fino al superamento di tutte le fasi più delicate di accrescimento, fioritura, fruttificazione e decadimento vegetativo, lo scambio metabolico con il terreno è continuo anche se più o meno accentuato e gli essudati radicali forniscono ai microrganismi fonti energetiche idonee soprattutto all'attivazione dei cicli biologici del carbonio e dell'azoto. Non meno importanti gli scambi di natura gassosa: la liberazione di anidride carbonica, anche in rapporto ai processi autotrofici e quella di ossigeno per l'esaltazione dei processi aerobici indispensabili al mantenimento degli equilibri nutrizionali ed alla prevenzione di accumulo di sostanze tossiche.

Le tecniche cromatografiche a scambio ionico e spettrofotometriche hanno permesso di individuare, negli escreti radicali di numerose specie vegetali, gruppi di composti organici di estremo interesse dal punto di vista della fisiologia microbica:

carboidrati: glucosio, fruttosio, arabinosio, saccarosio, maltosio, xilosio (H. Katznelson e Coll., 1955); I. C. Mac Rae, T. F. Castro, 1967);

acidi aromatici: paraidrossibenzoico, paracumarico, come predominanti di una serie di altri acidi organici di cui si presume la presenza (M. F. Kovacs jr., 1971);

acidi alifatici: lattico, malico, citrico, glicolico, ossalico, tartarico, succinico (M. F. Kovacs jr., 1971);

aminoacidi: evidenziati almeno 21 aminoacidi liberi di cui quantitativamente più frequenti l'a. aspartico, omoserina, treonina, lisina, a. glutammico, ornitina, arginina, valina;

il titolo aminoacidico tende a variare con aumento per alcuni quali l'a. glutammico e diminuzione per altri se gli essudati radicali vengono idrolizzati (A. D. Rovira, 1956; D. Boulter e Coll., 1966; I. C. Mac Rae, T. F. Castro, 1967);

vitamine del gruppo B: biotina, pantotenato, niacina, tiamina, piridossina e acido γ -aminobenzoico (A. D. Rovira, J. R. Harris, 1961; C. B. Sulochana, 1962);

enzimi: catalasi, cellulasi, fenolasi, ureasi, invertasi, proteasi, e lipasi;

sostanze biologiche attive di tipo auxinico e tossine la cui azione più o meno diretta sulla popolazione microbica della rizosfera è tutt'ora oggetto di discussione e di studio (N. Sethunathan, I. 1970; N. Sethunathan, II. 1970).

Questa rassegna sintetica è certamente sufficiente per far comprendere quale diretta influenza eserciti la pianta sulla popolazione microbica della propria rizosfera mediante una azione selettiva. Per tale aspetto la dominanza di microrganismi appartenenti a gruppi nutrizionali ben definibili, secondo la tecnica già citata di A. G. Lochhead, F. E. Chase (1943) potrebbe fornire elementi particolarmente utili sul comportamento vegetativo della pianta stessa. Specie, fase di sviluppo, stato di salute del vegetale influiscono qualitativamente e quantitativamente sugli essudati, mentre l'apparato radicale agisce anche indirettamente sulla flora microbica modificando struttura e natura del terreno della propria rizosfera. D'altronde è noto che azioni e reazioni non avvengono solo nella direzione radici microrganismi, ma questi a loro volta partecipano ai processi vitali della pianta con azioni di stimolo, per produzione di fattori di crescita (V. N. Vasantharajan, J. V. Bath, 1967; A. H. Vassain, V. Vancut, 1969) o con inibizioni per produzione di tossine e fitotossine (N. A. Krasil'nikov, 1958; T. M. McCalla, F. A. Haskins, 1964). Batteri, attinomiceti e funghi sono tutti interessati a queste interazioni e non mancano informazioni utili sull'argomento, almeno dal punto di vista della ricerca pura. Per l'aspetto pratico, agronomico, la mancanza di una

conoscenza più precisa sulla natura e la portata di tali processi trova, ancora oggi, parziale compenso solo nell'impiego di tecniche colturali atte a garantire, secondo i canoni tradizionali, la « buona coltivazione ».

La funzione indispensabile della flora microbica nei processi di mineralizzazione della sostanza organica e nella mobilitazione degli elementi minerali come calcio e fosforo (A. C. Gaur, K. K. R. Bhardwaj, 1971; A. Togwell Jackson, 1971; N. B. Paul, W. B. Sundara Rao, 1971) è nota e non esigerebbe alcun commento, se i fondamentali concetti di creazione e mantenimento di fertilità nel terreno, sempre validi ed appassionanti in senso assoluto, non richiedessero un aggiornamento proprio in rapporto all'evoluzione rapida e pressante delle tecniche e dei mezzi colturali che il consumismo rende sempre più disponibili. Basti pensare ai seri problemi di biodegradabilità posti dall'avvento dei diserbanti, degli insetticidi e dei detergenti, che se, per un certo aspetto ed in rapporto alla natura intrinseca del prodotto, alcune ricerche hanno dimostrato meno temibili del previsto (S. Carini, 1963; O. Verona, 1966), la pratica e quotidiana constatazione del loro graduale accumulo a livelli di discutibile opportunità e convenienza, anche nei terreni di coltura e specialmente in quelli irrigui (L. Federico Goldberg, 1969; L. Federico Goldberg, 1971), oggi più che mai porta necessariamente lo studio della microbiologia del terreno ad affrontare nuovi aspetti e problemi (G. Florenzano, 1971).

Anche quando parliamo di « effetti rizosfera » non possiamo sempre prescindere dalla validità di tali considerazioni.

EFFETTI RIZOSFERA E MICRORGANISMI NEL TERRENO

Le numerose ricerche condotte sugli essudati radicali hanno chiarito importanti meccanismi di azione delle piante sui microrganismi, d'altra parte tali fenomeni sono forse più accessibili e si prestano più facilmente alla sperimentazione di laboratorio. Più laboriosa e complessa si presenta l'indagine per lo studio degli effetti rizosfera nel senso microrganismo → pianta e ciò soprattutto per le difficoltà di stabilire un rapporto preciso di funzionalità. La tecnica di A. G. Lochhead e F. E. Chase (1943), e gli studi successivamente condotti sino al 1955 hanno recato un effettivo contributo per la messa in evidenza delle esigenze nutrizionali e del potere di sintesi dei microrganismi della rizosfera. La ricerca, tuttavia ha progredito oltre lo studio dei gruppi funzionali più noti e interessanti ai cicli biologici del carbonio e dell'azoto, estendendo le proprie

indagini anche a quei gruppi microbici definiti genericamente « banali », ma necessariamente riabilitati proprio per la riconosciuta loro funzionalità in taluni rapporti con la rizosfera, come nel caso di specie del genere *Pseudomonas* capaci di inattivare sostanze fenoliche nocive presenti negli essudati (E. Eklund, E. Sinda, 1971).

Nell'ambito della rizosfera la carica microbica totale è generalmente elevata e superiore rispetto a quella dello stesso terreno distante dall'apparato radicale e, oltre che con la specie vegetale, il fenomeno è in stretta correlazione con la fase vegetativa e con le condizioni chimico-fisiche del substrato stesso. Sono presenti i gruppi funzionali di maggiore interesse agronomico: fissatori di azoto liberi aerobi ed anaerobi, sull'attività dei quali tuttavia non è dato ancora oggi esprimere un giudizio decisivo in quanto le osservazioni, a volte contraddittorie, hanno portato alla constatazione di alternanze di inibizioni e di stimolazioni probabilmente connesse allo stadio di sviluppo della pianta.

Il rapporto simbiotico rizobi-leguminose è un capitolo tanto ricco di argomentazioni e così specifico che il volerlo inserire nella trattazione dei fenomeni di rizosfera è quasi fuori luogo, se si considera tale rapporto per le complesse interazioni tra pianta e microrganismo e per i numerosi fattori interni ed esterni, morfogenetici, genetici, metabolici e ambientali che regolano la formazione dei noduli radicali. In un certo senso, dal nostro punto di vista, è più interessante osservare che i rizobi, come i microrganismi fissatori d'azoto liberi, nella rizosfera anche indipendentemente dal contatto con la rizoplana, sono particolarmente sensibili alle azioni di stimolo o di inibizione degli escreti radicali e soprattutto dei fitormoni di natura auxinica tipo acido β -indolacetico, come provato da G. K. K. Link e Coll. (1937, 1940, 1941); questi organismi sono pure sensibili alla presenza di microelementi quali molibdeno e boro come provato da H. L. Jensen (1946, 1948), da A. J. Anderson e Al. (1945) e da E. G. Mulder (1950) per il primo e da E. Moschini (1951) per il boro; Autori tutti citati da J. Pochon e H. De Barjac (1958).

Carenze o concentrazioni non equilibrate di tali fattori metabolici possono indurre veri e propri fenomeni di parassitismo a favore dei rizobi con sospensione della loro funzione primaria, se tale si considera per l'aspetto e per l'interesse agronomico.

pH, calcare, concimazioni azotate sono altri fattori esterni che pure agiscono nella rizosfera sui rizobi e più ancora sulla loro efficienza. Osservazioni interessanti hanno da tempo confermato che la microflora rizosferica delle leguminose è assai più ricca rispetto a quella delle altre famiglie, come constatato da R. L. Starkey (1931) e da M. T. Timonin

(1940), sempre secondo quanto riferito da I. Pochon e H. De Barjac (1958).

I batteri denitrificanti o meglio quelli dotati di potere denitrificante compaiono in numero sempre elevato e sono facilmente isolabili. Non è dato sapere però in quale misura essi possano interferire nei processi nutrizionali dei vegetali superiori nella asportazione dell'azoto nitrico. È accertato comunque che la presenza di altri accettori di elettroni nel terreno, tende ad equilibrare gli effetti negativi di questi fenomeni riduttivi e ciò è tanto più valido per tensioni di ossigeno quali si possono riscontrare a livello degli apparati radicali (I. C. Mac Rae, T. F. Castro, 1967). Inoltre non esiste un rapporto tra titolo di azoto nitrico e numero di microorganismi dotati di potere denitrificante e ciò è stato di recente confermato anche da Von E. Küster (1970), almeno per substrati di tipo paludoso.

Dopo questa rapida rassegna dei raggruppamenti funzionali più noti vorrei brevemente accennare a quei microorganismi meno citati in letteratura e meno discussi, ma la cui identificazione e frequenza nella rizoplana e nella rizosfera testimoniano una partecipazione attiva e specifica ad interazioni di natura sinergica o antagonista, utili essenzialmente al mantenimento degli equilibri biologici tra vegetali superiori ed inferiori.

Nel complesso le ricerche dimostrano che la specie vegetale, l'età, la fase di crescita, lo stato vegetativo della pianta differenziano qualitativamente la flora microbica della rizoplana e della rizosfera. Nella prima, almeno per le specie fungine, si stabilisce in genere un vero e proprio rapporto selettivo; tale fenomeno sembra meno avvertito per batteri e attinomiceti che tuttavia caratterizzano la rizosfera quantitativamente e non è errato, in tal caso, parlare di funzionalità.

Indipendentemente dai gruppi funzionali più noti, i microorganismi che maggiormente interessano a livello di rizoplana e di rizosfera appartengono ai generi; funghi: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Phoma*; batteri: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*; specie diverse appartenenti al genere *Actinomyces*. Questo genere compare quasi sempre nella popolazione microbica rizosferica, tuttavia sembra che da questo punto di vista non sia stato diffusamente studiato, salvo per gli effetti indotti da regolatori di crescita (N. Sethunathan, I 1970, II 1970). Allo stato dell'attuale documentazione si può solo presumere che la funzionalità di questo genere, in rapporto ai vegetali superiori, non sia del tutto specifica ma più direttamente dipendente dal substrato e dal

suo contenuto in sostanze organiche. La capacità degli attinomiceti di metabolizzare le sostanze più diverse è nota, resta però da stabilire se il loro incremento numerico nella rizosfera rispetto alla non rizosfera si traduca in un rapporto di saprofitismo ugualmente e selettivamente utile alla pianta.

Tra i vegetali superiori aventi rapporti con le attività microbiche sopra segnalate, i più noti appartengono alle famiglie delle *Leguminose*, *Papilionaceae* e delle *Graminaceae*. Altri generi citati di frequente appartengono alle: *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Linaceae*, *Cruciferae*, *Chenopodiaceae*, *Urticaceae*, *Liliaceae*, *Amarantaceae*, *Scrophulariaceae*, *Elaeaniaceae*, *Ericaceae*, *Betulaceae*, *Myricaceae*, *Casuarinaceae*, *Pinaceae* e *Cupressaceae*.

Ritengo che non sia opportuno insistere su citazioni che d'altronde richiederebbero una disquisizione approfondita e la cui reperibilità è agevolata da fonti bibliografiche autorevoli, facilmente accessibili.

ALCUNI ASPETTI ECOLOGICI DELL'EFFETTO RIZOSFERA

Sono stati richiamati sin qui gli aspetti che caratterizzano le interazioni tra piante e microrganismi e si è sottolineata la funzione intermedia del terreno, è però altrettanto importante aggiungere che l'evoluzione di tali fenomeni è condizionata da comuni fattori ambientali naturali e da interventi esterni. La pianta ed i microrganismi nella rizosfera sono più o meno direttamente influenzati dalla durata ed intensità di illuminazione che agisce sulle attività e sugli scambi metabolici (A. D. Rovira, 1959; V. B. Srivastava, 1971), dalla natura fisico-chimica del terreno connessa alle intrinseche caratteristiche pedologiche, dalla disponibilità di elementi organici e minerali come fonti energetiche e substrati d'attacco, dalla tensione di ossigeno e dalla produzione di anidride carbonica ai diversi livelli, dal pH, la cui funzione determinante sugli equilibri fisiologici dei vegetali è altrettanto importante per il mantenimento della disponibilità delle fonti nutrizionali.

La temperatura e le escursioni termiche stagionali possono condizionare gli « effetti rizosfera » agendo sulle piante e sui microrganismi, tuttavia la maggior parte dei Ricercatori, considerati i limiti di tolleranza delle une e degli altri, non ritiene possibile stabilire dati precisi se non si considerano contemporaneamente le azioni concomitanti di altri fattori ecologici quali ad esempio: l'umidità del substrato, le caratteristiche varietali dei vegetali e quelle associative di tutti gli organismi re-

sponsabili dei processi biologici nella rizosfera. E. H. Richards (1939), citato da J. Pochon e H. De Barjas (1958), ha dimostrato sperimentalmente come il tasso di fissazione di azoto da parte di *Azotobacter* possa presentare due temperature ottimali secondo che il microrganismo sia associato o meno a batteri amilolitici del gruppo *Aerogenes*.

Generalmente, per incrementi di temperatura non oltre il limite ottimale, si verificano aumenti della carica microbica e la questione assume un'importanza applicativa rilevante dal punto di vista agronomico per i substrati preminentemente organici, torbe e terricciati, impiegati per colture floricole di serra che esigono particolari temperature di fondo nei bancali. È comprensibile come variazioni sensibili di temperature possano stimolare o rallentare i processi di mineralizzazione e gli stessi « effetti rizosfera » e quindi, nel complesso, agire sugli scambi nutrizionali.

Ho pure parlato di interventi esterni quali fattori, vorrei dire occasionali, la cui influenza nell'ambito della rizosfera può divenire determinante nelle interazioni pianta-microrganismi. Accennerò semplicemente ai più importanti, previsti dalle comuni pratiche colturali agrarie e dalle tecniche specializzate per colture protette: la concimazione, le lavorazioni e la sterilizzazione del terreno e dei substrati.

L'apporto di elementi minerali e organici con concimi solubili o con fertilizzanti a lento effetto (slow release) (R. Landi, 1970), può modificare quantitativamente e qualitativamente la popolazione microbica rizosferica, deprimendo o stimolando selettivamente i differenti gruppi funzionali ed il fenomeno è tanto più evidente quanto più accentuata è l'inerzia chimica del substrato. Così per i letti minerali, silicei o artificiali o come per i materiali torbosi che nella migliore delle ipotesi, sono dotati di sola fertilità potenziale. Ricerche recenti in substrati di rizosfera di *Philodendron pertusum* (G. Banfi, 1970) dimostrano incrementi di carica microbica del 60% per le piante concimate con un fertilizzante organico-minerale (7-7-7) rispetto a quelle non trattate. Gli incrementi per i singoli gruppi funzionali, in ordine decrescente, sono risultati: per i batteri nitrificanti nitrosi 67,8%, per i fissatori liberi d'azoto anaerobi 61,4%, per i cellulosolitici anaerobi 51,6%, per i batteri dotati di potere denitrificante 48,3%, per gli ammonificanti 41,7%, per i batteri nitrificanti nitrici 38,7%, mentre per i batteri solfato-riduttori si è verificata una riduzione del 32,6%. In questo caso è evidente l'esaltazione dei processi ossidativi e della fertilità biologica del substrato a beneficio del vegetale superiore e ciò è anche dimostrato dai risultati sperimentali di produzione tuttora in corso di elaborazione.

Non mi soffermo su questo argomento poiché una trattazione sia pure contenuta, supererebbe i confini della rizosfera e dei suoi effetti e ciò vale anche per le modificazioni fisiche e di struttura che le lavorazioni manuali o meccaniche possono provocare sulle attività microbiche della rizosfera.

L'essiccazione e la sterilizzazione dei terreni e dei substrati per colture protette sono oggetto di studio e di discussione, ma la questione è ben più complessa di quanto non sembri perché essa richiede una duplice soluzione: chimica (G. W. Skyring, J. P. Thompson, 1966; P. O. Salenius e Coll., 1967) e microbiologica (A. D. Rovira, G. D. Bowen, 1966). I risultati sperimentali, sembra non possano ancora suggerire un'applicazione pratica agronomicamente conveniente, mentre dal punto di vista fitosanitario il problema non pone discussione e pare non sussistano alternative di scelta.

Esistono relazioni tra « effetti rizosfera » e agenti patogeni? Senza dubbio l'argomento è essenzialmente di competenza del fitopatologo ma dal punto di vista del « fenomeno rizosfera » è altrettanto importante riconoscere la funzione che gli essudati radicali e la stessa flora microbica rizosferica, saprofiti possono esercitare per mezzo di azioni antagoniste. Le interazioni, tuttavia, sono estremamente complesse e condizionate da fattori ambientali. I microrganismi sono capaci di produrre antibiotici attivi sui vegetali inferiori quanto sul metabolismo dei vegetali superiori e d'altra parte è noto che le piante stesse possono elaborare sostanze ad azione antibatterica e antifungina; ricorderemo in proposito: *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Allium porrum* (J. H. Clarke, 1966), *Tulipa gesneriana* (E. Corberi, 1955), i generi *Geranium* (M. Galanti, P. Manil, 1954) e *Juglans* (O. Verona, M. Fagioli, 1952) ed altri generi di piante esotiche brasiliane (G. Picci, 1955), citati da J. Pochon e H. De Barjac.

Della flora fungina sensibile all'azione inibente degli elaborati di vegetali superiori troviamo citati i generi: *Fasarium*, *Phymatotrichum*, *Plasmodiophora*, (J. Pochon, 1958), *Cylindrocarpon* e *Gliocladium* (R. R. Mishara, 1967).

Concludo questi semplici cenni aggiungendo che lo studio dei rapporti « effetti rizosfera » ed agenti patogeni riveste ancora oggi un'importanza particolare per il duplice interesse scientifico ed applicativo, soprattutto per il contributo che esso può recare alla ricerca nel campo del miglioramento genetico vegetale per la resistenza alle malattie.

EFFETTI RIZOSFERA NELLE COLTURE IDROPONICHE

Quanto è stato detto per il terreno, da un punto di vista teorico, dovrebbe valere anche per i mezzi colturali idroponici.

Occorre subito premettere che non è appropriato parlare di « microbiologia delle colture idroponiche prescindendo dalla presenza contemporanea di substrati di coltivazione, solidi e liquidi, e di vegetali superiori. Il fenomeno rizosfera diviene perciò l'aspetto dominante che non può sfuggire all'attenzione del microbiologo e dell'agronomo, sia che essi sperimentino con tecniche idroponiche in vitro o in ambienti rigorosamente controllati, sia che essi operino per finalità produttive.

Valido restando tale principio teorico, nell'uno e nell'altro caso, per l'aspetto applicativo tuttavia si impone una precisa distinzione. È noto infatti che i primi passi sulla via degli studi della nutrizione vegetale e della fisiologia furono mossi da eminenti Ricercatori che riconobbero la impossibilità di lavorare con un substrato tanto complesso come il terreno. Vennero così elaborate formule saline, dalle minerali più semplici di Knop, di Tottingham, di Crone, di Hoagland (S. Tonzig, E. Marrè, 1965) alle più complesse e arricchite di elementi organici e di fattori di crescita come quelle di J. P. Nitsh e Coll. (1967, 1969), specificamente idonee al radicamento di plantule da meristemi e da micropore.

Occorse un certo periodo di tempo, quasi 50 anni, e la concomitanza di particolari circostanze completamente estranee alle finalità scientifiche, perché la ricerca di laboratorio si tramutasse in sperimentazione di serra e in pratica agronomica produttiva. Questi, in sintesi estrema, l'origine e l'evoluzione delle tecniche di coltura « senza terra » che tanto ha contribuito e giova tuttora allo studio degli equilibri nutrizionali (M. V. Homès, G. H. Van Schoor, 1969), delle carenze nutrizionali (G. Banfi, V. Cavazzoni, 1963; G. Banfi, 1967) e in particolare degli « effetti rizosfera » per tutti gli aspetti già considerati. In particolare la composizione quali-quantitativa degli escreti radicali, la produzione di sostanze biologiche attive come fattori di crescita, fitormoni, vitamine, antibiotici e fitotossine.

Le fonti bibliografiche, numerose quanto le iniziative sperimentali, nella maggior parte dei casi documentano formule e mezzi impiegati e soprattutto provano la validità del sistema colturale, quale mezzo di ricerca controllata di laboratorio.

Dal canto suo, la coltivazione « senza terra » delle colture protette

propone alcune considerazioni di rilevante interesse agronomico. In laboratorio, gli effetti « rizosfera » si riproducono e si analizzano, ma in serra si producono per via naturale e la loro evidenziazione non è sempre facile, anche se il sistema è suscettibile di controllo, perché i rapporti tra pianta e microrganismo avvengono senza la mediazione del terreno, in presenza di soluzioni minerali ben definite e di substrati chimicamente inerti.

La differenza sostanziale tra « effetti rizosfera » nell'idroponica e nel terreno, per l'aspetto microbiologico, è quasi esclusivamente determinata dalla funzionalità del substrato minerale o prevalentemente minerale.

Il concetto di fertilità potenziale nel terreno agrario su cui si fondano tutte le premesse di una « microbiologia del terreno » non è altrettanto valido se applicato ai letti di coltura idroponica, poiché la sola fertilità di cui possono e devono disporre è l'immediata, costante disponibilità di elementi assimilabili da parte delle piante.

Una ipotetica riserva nutritiva per aumento di concentrazione salina nel substrato idroponico porterebbe necessariamente ad una rapida sicura perturbazione degli equilibri chimici e della reazione del mezzo e la pianta ne soffrirebbe per eccesso o per carenza (T. Wallace, 1961). Pertanto l'indispensabile funzione mineralizzatrice della flora microbica che nel terreno crea e garantisce la disponibilità nutritiva per i vegetali, in idroponica viene a cessare. Le caratteristiche preminentemente saprofitiche della popolazione microbica, in rapporto agli scambi metabolici degli apparati radicali, inducono processi selettivi d'arricchimento della rizosfera.

La natura fisica e pedologica del substrato solido minerale, la granulometria, la struttura, la porosità, la morfologia, l'origine chimica dei substrati artificiali, il grado di inibizione, sono importanti quanto la stessa composizione chimica delle soluzioni nutritive.

Direi che la nota dominante in contrapposizione alla disponibilità di tutti gli elementi minerali, microelementi compresi, è proprio l'assenza di sostanza organica, quale mediatrice e dispensatrice dei più importanti complessi umici. Se le tecniche idroponiche vengono applicate secondo principi tecnologici appropriati e l'inquinamento organico è tutto al più limitato alla presenza di pochi residui vegetali, nelle soluzioni nutritive riciclati, sono difficilmente reperibili gruppi microbici funzionali, attivi decompositori, quali cellulosolitici e attinomiceti. Sovente la stessa flora fungina polifaga è scarsa, mentre per alcuni gruppi microbici interessati al ciclo dell'azoto, la loro specifica attività e re-

peribilità sembra direttamente dipendere dalla presenza o meno della fonte minerale azotata e dalla forma in cui essa è disponibile. Ciò è stato provato dalle recenti ricerche di W. Balloni e M. R. Celestre (1970) per i fissatori liberi d'azoto aerobi in colture idroponiche di fragola e da quelle di G. Banfi e E. Cecere (1971) per i batteri nitrificanti in coltura di crisantemo.

Variazioni e correzioni di pH che generalmente devono mantenere valori subacidi, variazioni di concentrazione salina per depauperamento delle soluzioni da parte delle piante, o per reintegrazione dei titoli iniziali, normalmente contenuti entro limiti oscillanti dall'1,5 al 2,5‰, possono provocare aumenti e flessioni periodiche o improvvise della carica microbica totale da minimi di 150000-200000 germi per cc. di soluzione ad alcune decine di milioni. Per colture di pomodoro (Marmande, Peerson S) e di *Philodendron pertusum* è stato ad esempio osservato che ad un aumento di concentrazione di elementi fertilizzanti spesso corrisponde, ai saggi biochimici, un certo rallentamento di alcune reazioni, come per il potere proteolitico e per quello lipolitico per l'azione su alcuni idrati di carbonio (G. Banfi, 1963; G. Banfi, 1970.).

Esistono le premesse perché il substrato minerale idroponico, solido o liquido, offra condizioni ambientali favorevoli per processi biologici tipicamente autotrofi, tanto che l'esaltazione di gruppi microbici dotati di tali esigenze e di potere elevato di sintesi risulterebbe del tutto normale, W. Balloni e M. R. Celestre (1970) confermano infatti la presenza di microalghe verdi e verdi-azzurre con cariche minime di 100000 e massime di 500000 per cc. di liquido nutritivo, in coltura di fragola.

È risaputo inoltre che, per l'aspetto pratico, la possibilità e convenienza di prevenire la diffusione di alghe alla superficie dei substrati idroponici sono da tempo discusse ed il problema può ritenersi in parte risolto con opportune pratiche di pacciamatura o con appropriata regolazione dei circuiti idraulici.

D'altronde la presenza dei vegetali superiori e degli stessi organismi inferiori può modificare profondamente le condizioni del mezzo, basti considerare che la densità di investimento della superficie coltivabile è superiore dell'80-85% rispetto a quella dei terreni agrari e che in vasche normali, profonde 30-40 cm le piante affondano una massa voluminosa di radici nel substrato solido, impregnato di soluzione nutritiva in quantità pari circa alla metà del proprio volume. È quindi comprensibile come le interazioni dell'intero sistema pianta-substrato-microrganismi si traducano in « effetti di rizosfera » e come, in tal caso, si possa parlare di « microbiologia delle colture idroponiche », anche se

gli aspetti funzionali di reversibilità dei componenti il sistema sono ancora poco noti.

Il metabolismo radicale della pianta agisce sicuramente sulla flora microbica e ciò è stato ripetutamente provato, ma quali siano gli interventi più o meno diretti dei microrganismi sui vegetali superiori nei substrati idroponici e quindi le reazioni che ne seguono deve essere ulteriormente approfondito.

In una rassegna comparsa recentemente sulla rivista Agricoltura (G. Banfi, 1971) sono riportati dati significativi riguardanti ricerche sulla popolazione microbica in colture idroponiche ortive. Se ne deduce che la microflora eterotrofa saprofito è comunque molto attiva e che la richiesta di aminoacidi e fattori di crescita è elevata. Le specie microbiche più frequentemente isolate da coltivazioni di pomodoro, melanzana e cicoria sono così ripartite tra i generi: *Pseudomonas* 20%, *Flavobacterium* 20%, *Achromobacter* 10%, *Bacillus* 10%, *Corynebacterium* 10%, *Micrococcus* 10%, *Microbacterium* 5%, *Mycobacterium* 5%, *Bacterium* 5%, *Lactobacillus* 5%.

Poiché per le caratteristiche dell'ambiente idroponico è improprio parlare di cicli biologici, nel significato di una evoluzione delle sostanze organiche a favore di processi di mineralizzazione analoghi a quelle del terreno, la messa in evidenza di gruppi microbici funzionali di importanza agronomica è interessante soprattutto se correlata alla maggiore o minore stabilità degli equilibri chimici delle soluzioni minerali bilanciate ed alle esigenze nutritive e capacità produttive delle colture.

Nel ciclo dell'azoto le interazioni tra vegetali superiori ed inferiori possono, per certi aspetti, divenire competitive come nel caso specifico dell'asportazione o demolizione dei nitrati. Infatti il titolo di questi, per assorbimento e successivi processi riduttivi metabolici della pianta o per riduzione microbiologica tende, nelle soluzioni nutritive, a diminuire rapidamente ed esige reintegrazioni frequenti, soprattutto durante la maggior attività vegetativa.

Il potere denitrificante risulta sempre elevato; rilievi su coltivazioni invernali di pomodoro (G. Banfi e E. Cecere, 1967) misero in evidenza che il 70% dei microrganismi isolati riduceva i nitrati e che di questi il 28,5% riduceva solo in ambiente aerobico e il 71,5% anche anaerobicamente. Nella rizoplana i processi anaerobici risultarono più accentuati. Si poterono isolare in coltura pura 4 microrganismi, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter cycloclastes*, *Flavobacterium solare* ed un ceppo di *Nocardia*.

Del potere azotofissatore e del potere nitrificante si è detto preceden-

temente come tali processi dipendano essenzialmente dalla natura e concentrazione della fonte azotata presente nel mezzo; mentre gli *Azotobacter* possono risultare assenti, l'ossidazione biologica di sali ammoniacali, può assumere valori anche elevati e portare a fenomeni d'accumulo di nitriti nella soluzione nutritiva, in concomitanza con riduzione di nitrati, se presenti, come osservato per il crisantemo (G. Banfi, E. Cecere, 1971).

Anche il potere ammonificante, frequentemente elevato è senza dubbio in connessione con gli « effetti rizosfera », in rapporto al contenuto amioacidico degli escreti radicali. Il potere proteolitico, comune a molti microrganismi, è diffuso, tuttavia richiede una più attenta documentazione poiché mancano informazioni e dati in proposito.

Tre elementi minerali: fosforo, calcio e ferro, indipendentemente da una loro indispensabilità per la nutrizione vegetale, presentano un particolare interesse microbiologico anche nei substrati idroponici. È da sottolineare infatti che la perturbazione più grave degli equilibri chimici della maggior parte delle soluzioni minerali bilanciate, qualunque sia la composizione scelta, è causata da una precipitazione voluminosa di fosfati metallici e calcio e ferro ne sono costantemente coinvolti. Ciò almeno si verifica quando le variazioni di pH tendono a valori decisamente subalcalini per attività metabolica della pianta e degli stessi effetti rizosfera. Tale graduale sedimentazione nei diversi strati del substrato solido può portare ad inconvenienti non indifferenti d'ordine pratico oltre che chimico.

A parte la considerazione che la necessità di impedire o prevenire tali inconvenienti è ovvia, l'intervento microbico come processo di mobilitazione del fosforo, del calcio e del ferro non va trascurato; infatti A. C. Gaur e K. K. R. Bhardwaj (1971), N. B. Paul e W. V. B. Sundara Rao (1971) in recenti lavori citano specie di microrganismi appartenenti al genere *Bacillus* capaci di solubilizzare attivamente i fosfati in colture di *Triticum vulgare*, *Trifolium alexandrinum* e *Phaseolus aureus*.

Della mobilitazione del calcio da silicati e da carbonati è stato riferito rispettivamente da A. Togwell Jackson (1971) e da G. Banfi, V. Cavazzoni (1961) e G. Banfi (1971). Da isolamenti di coltivazioni ortive il 13,5% dei microrganismi è risultato capace di solubilizzare il carbonato di calcio.

Diversamente dal fosforo, il potassio, generalmente, non desta preoccupazioni nella conduzione del sistema idroponico se controllato periodicamente, il metabolismo potassico è meno sensibile alle perturbazioni chimiche del substrato ed è più direttamente connesso all'attività assor-

bente dei vegetali. Per questo soprattutto l'intervento della flora microbica, discusso dalla scuola russa per la mobilizzazione biologica dell'elemento da parte dei silicobatteri nel terreno, nei substrati idroponici non ha destato particolare interesse.

Per lo zolfo non sussistono problemi specifici se l'areazione del substrato è garantita dal normale riciclo delle soluzioni nutritive; processi anaerobici riduttivi potrebbero influire negativamente, ma ciò è poco probabile anche se il *Vibrio desulfuricans* o specie affini di batteri solfato-riduttori sono di frequente presenti nelle soluzioni. Nella rizopiana il pH e la tensione di ossigeno ostacolano generalmente l'insediamento di questi microrganismi anaerobi stretti.

Una segnalazione di H. B. Gunner e Collaboratori (1966), anche se connessa indirettamente alla pratica idroponica, mi sembra interessante relativamente al metabolismo batterico di alcuni coccobatteri e attinomiceti del genere *Streptomyces*, capaci di attaccare e utilizzare prodotti fosfororganici del tipo Diazinon preferenzialmente come fonte di zolfo e successivamente di fosforo, di calcio e di azoto.

Tra gli elementi minori o microelementi la somministrazione del ferro presenta alcune difficoltà analoghe a quelle del fosforo. La instabilità chimica e la reversibilità delle reazioni ossido-riduttive, i processi ossidativi con conseguenti precipitazioni rendono alquanto precaria la sua disponibilità. Infatti, se l'impiego di citrato di ferro ammoniacale e di chelati in sostituzione di solfati e di cloruri è chimicamente ineccepibile, dal punto di vista microbiologico non ha totalmente risolto il problema, tanto più che nel citrato ammoniacale di ferro il radicale organico rappresenta una fonte nutritiva appetita da numerosi microrganismi e da taluni in particolare (F. Abramo, G. Banfi, 1956; Y. Pares, 1964). Tale meccanismo biologico di liberazione del ferro in forma ossidabile e insolubile non è specifica, ma propria delle specie organotrofe proteolitiche ed ammonificanti.

La funzione catalizzatrice di alcuni microelementi nei processi biologici è nota da tempo e ancora discussa particolarmente per manganese, molibdeno e boro, nonché per rame e zinco (J. H. Becking, 1961; G. Banfi, 1963). Salvo alcuni riferimenti alla probabile azione dello zinco sul rallentamento di processi riduttivi dei nitrati (G. Banfi, 1971), per l'idroponica non esiste una documentazione specifica.

CONCLUSIONE

Abbiamo esaminato alcuni argomenti di maggiore interesse riguardanti gli « effetti rizosfera » nel terreno e nell'idroponica. I temi trattati, nonché le lacune sono sufficientemente numerosi, ma non si possono approfondire o colmare in una semplice relazione informativa.

La ricerca pura, per certi aspetti, può ritenere in parte soddisfatte le proprie finalità scientifiche anche in un progredire graduale della sperimentazione, ma le esigenze applicative, il più delle volte, incalzano e non attendono, anche se molti quesiti non sono stati sufficientemente spiegati e molte ipotesi permangono tali. Questa sfasatura di modi e di tempi fra scienza pura e applicata può divenire tuttavia più apparente che reale se una collaborazione fattiva, quale oggi più che mai tutti auspichiamo, porterà ad un reciproco volenteroso accostamento nell'affrontare studi e problemi di comune interesse e nel discuterli.

Ritengo che questa sede, che tanto confortevolmente ci ospita oggi, possa rappresentare anche per il futuro un punto di incontro particolarmente adatto per un colloquio aperto e cordiale ed uno scambio proficuo di iniziative e di propositi.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMO F., BANFI G. — *Ricerche sulla corrosione metallica e sul concorso di attività microbiologiche in apparati idrodinamici ferroviari in presenza di anticongelanti*. Ingegneria Ferroviaria, 9, 677-692 (1956).
- BALLONI W., CELESTRE M.R. — *Indagini microbiologiche sulle colture idroponiche di fragola. Microflora e nutrizione minerale della fragola in coltura idroponica*. Ann. Ist. Sper. Frutticoltura, 1, 33-47 (1970).
- BANFI G. — *Attività fissatrice di un ceppo di Azotobacter chroococcum in presenza di zinco*. Ann. Micr., 13, 19-25 (1963).
- BANFI G. — *Effetti di trattamenti con solfato di zinco e di manganese su pomodoro, lattuga e garofano in coltura idroponica*. Agrochimica, 11, 557-564 (1967).
- BANFI G. — *Alcuni aspetti microbiologici delle soluzioni minerali idroponiche*. Colture Idroponiche FNDSA, 11, 109-119 (1963).
- BANFI G. — *Caratteristiche microbiologiche di un substrato torboso*. Agrochimica, 15, 20-27 (1970).
- BANFI G. — *Microbiologia delle colture idroponiche*. Agricoltura, 9, 32-40 (1971).
- BANFI G., CAVAZZONI V. — *Ricerche sulla microflora delle soluzioni minerali idroponiche*. Ist. Lomb. Accad. Scienze e Lettere (B), 95, 35-52 (1961).
- BANFI G., CAVAZZONI V. — *Influenza dello zinco in soluzioni nutritive non bilanciate su piantine di mais durante le prime fasi vegetative*. Agrochimica, 7, 314-322 (1963).

- BANFI G., CECERE E. — *Studio di microrganismi interessati ai processi di riduzione di nitrati nelle soluzioni idroponiche. Isolamento e identificazione di quattro ceppi.* Ann. Micr., 17, 99-114 (1967).
- BANFI G., CECERE E. — *Ricerca su processi di nitrificazione in soluzione idroponica per crisantemo (Chrysanthemum morifolium). Isolamento e identificazione di 4 ceppi interessati a questi fenomeni.* Agrochimica, 15, 328-335 (1971).
- BECKING J.H. — *Studies on the nitrogen-fixing bacteria of the genus Beijerinckia. II. Mineral nutrition and resistance to high levels of certain elements in relation to soil type.* Plant and Soil, 14, 297 (1961).
- BOULTER D., JEREMY J.J., WILDING M. — *Aminoacids liberated into the culture medium by pea seedling roots.* Plant and Soil, 24, 121-127 (1966).
- CARINI S. — *Sull'azione dei diserbanti selettivi nei riflessi dei microrganismi delle coltivate prative. Nota I: i diserbanti e la microflora del terreno.* Ann. Micr., 13, 1-9 (1963).
- CLARKE J.H. — *Studies on fungi in the root region. V. The antibiotic effects of root extracts of Allium on some root surface fungi.* Plant and Soil, 25, 32-40 (1966).
- EKLUND E., SINDA E. — *Establishment and disappearance of introduced Pseudomonads in the rhizosphere of peat grown cucumber plants.* Plant and Soil, 35, 495-504 (1971).
- FEDERICO GOLDBERG L. — *L'inquinamento delle acque d'irrigazione e conseguenti danni alle foraggere.* Soc. It. Progr. Zootec., Atti IV Simp. Int. di Zootecnia, 384-407 (1969).
- FEDERICO GOLDBERG L. — *L'inquinamento delle acque destinate alla agricoltura.* Bollettino dell'Agricoltura, gennaio 1971.
- FLORENZANO G. — *Conseguenze delle contaminazioni sulle basi biologiche della fertilità del suolo.* Atti Tavola Rotonda SISS (1971).
- GAUR A.C., BHARDWAJ K.K.R. — *Influence of sodium humate on the crop plants inoculated with bacteria of agricultural importance.* Plant and Soil, 35, 613-631 (1971).
- GIRARD H. ROUGEUX R. — *Techniques de microbiologie agricole.* Dunot (1967).
- GUNNER H.B., ZUCKERMAN B.M., WALKER R.W., MILLER C.W., DEUBERT KARL H., LONGLEY RUTH E. — *The distribution and persistence of diazinon applied to plant and soil and its influence on rhizosphere and soil microflora.* Plant and Soil, 25, 249-264 (1966).
- HOMES M.V., VAN SCHOOR G.H. — *La nutrition minérale des végétaux* (1969).
- HUSSAIN A., VANCURA V. — *Formation of biologically active substance by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth.* Folia Microbiologica Academia Scientiarum Bohemoslovaca, 15, 468-478 (1970).
- JACKSON TOGWELL A. — *Short communication biochemical weathering of calcium-bearing minerals by rhizosphere microorganisms, and its influence on calcium accumulation in trees.* Plant and Soil, 35, 655-658 (1971).
- KATZNELSON H., ROUATT J.W., PAYNE T.M.B. — *Liberation of aminoacids and reducing compounds by plant roots.* Plant and Soil, 7, 35 (1955).
- KOVACS M.F. JR. — *Identification of aliphatic and aromatic acid in root and seed exudates of peas, cotton and barley.* Plant and Soil, 34, 441-451 (1971).
- KRASIL'NIKOV N.A. — *Soil microorganisms and higher plants.* Acad. of Sci. of the U.R.S.S., 265-409 (1958).

- KRASIL'NIKOV N.A. — *Soil microorganisms and higher plants*. Acad. of Sci. of the U.R.S.S., 329-348 (1958).
- KUSTER E. (VON) — *Der einfluss von Ca — und N — gaben auf mikrobielle aktivitäten in moorböden und torf. Stand und leistung agrikulturchemischer und agrarbiologischer*. Forschung, 19, 115-124 (1970).
- LANDI R. — *I problemi della concimazione azotata ed i nuovi fertilizzanti a lento effetto*. Accademia Economico-Agraria dei Georgofili, 27, 1-42 (1970).
- LOCHHEAD A.G., CHASE F.E. — *Qualitative studies of soil microorganisms: V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora*. Soil Sci., 55, 189-195 (1943).
- MAC RAE I.C., CASTRO T.F. — *Root exudates of the rice plant in relation to Akagare, a physiological disorder of rice*. Plant and Soil, 26, 317-323 (1967).
- MCCALLA T.M., HASKINS F.A. — *Phytotoxic substances from soil microorganism and crop residues*. Bacteriological Reviews, 28, 181-207 (1964).
- MISHRA R.R. — *Nature of rhizosphere fungal flora of certain plants*. Plant and Soil, 27, 162-166 (1967).
- NITSCH J.P., NITSCH C., ROSSINI L.M.E., BUI DANG HA D. — *The role of adenine in bud differentiation*. Phytomorphology, marzo-dicembre, 446-453 (1967).
- NITSCH J.P., NITSCH C. — *Haploid plants from pollen grains*. Science, 163, 85-87 (1969).
- PARES Y. — *Action de Serratia marcescens dans le cycle biologique des métaux*. Ann. Inst. Past., 107, 136 (1964).
- PAUL N.B., SUNDARA RAO W.V.B. — *Phosphate dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes*. Plant and Soil, 35, 127-132 (1971).
- POCHON J., DE BARJAC H. — *Traité de microbiologie des sols. Applications agronomiques*. Dunot, 421, 422, 424, 437, 443 (1958).
- POCHON J., TARDIEUX P. — *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. La Tourelle, (1962).
- ROVIRA A.D. — *Plant excretion in relation to the rhizosphere effect*. Plant and soil, 7, 178 (1956).
- ROVIRA A.D. — *Root excretions in relations to the rhizosphere effect: IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exudation*. Plant and Soil, 11, 53-64 (1959).
- ROVIRA A.D., HARRIS J.R. — *Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect: V. The exudation of B-growth vitamine*. Plant and Soil, 14, 199-214 (1961).
- ROVIRA A.D., BOWEN G.D. — *The effects of micro-organisms upon plant growth. II. Detoxication of heat-sterilized soils by fungi and bacteria*. Plant and Soil, 25, 129-142 (1966).
- SALONIUS J.B., ROBINSON J.B., CHASE F.E. — *A comparison of autoclaved and gamma-irradiated soils as media for microbial colonization experiments*. Plant and Soil, 27, 239-248 (1967).
- 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).
- SKIRING G.W., THOMPSON J.P. — *The availability of organic matter in dried and in-*

- dried soil, estimated by an anaerobic respiration technic.* Plant and Soil, 24, 289-298 (1966).
- SRIVASTAVA V.B. — *Investigation into rhizosphere microflora. VIII. Light and dark treatments in relation to root-region microflora.* Plant and soil, 35, 463-470 (1971).
- SULOCHANA C.B. — *B-vitamins in root exudates of cotton.* Plant and Soil, 3, 327 (1962).
- TONZING S., MARRE E. — *Elementi di botanica I, CEA* (1965).
- VASANTHARJAN V.N., BHAT J.V. — *Interrelations of soil micro-organisms and mulberry. I. Phytohormone production by soil and rhizosphere bacteria and their effect on plant growth.* Plant and Soil, 27, 261-272 (1967).
- VERONA O. — *Microbiologia agraria.* UTET, 468 (1966).
- WALLACE T. — *The diagnosis of mineral deficiencies in plants by visual symptoms.* HMSO (1961).

CENTRO DI STUDIO DEI MICRORGANISMI AUTOTROFI DEL CNR
ISTITUTO DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
DELL'UNIVERSITA' DI FIRENZE

GINO FLORENZANO

FONDAMENTI BIO-ECOLOGICI DELL'HABITAT RADICALE E PROSPETTIVE DI CONTROLLO DELL'EFFETTO RIZOSFERA

Se i rapporti pianta-microrganismi interessano sul piano generale ogni organo, apparato e probabilmente gli stessi tessuti della pianta (Verona, 1972) la espressione massima delle interazioni con i microrganismi si ha a livello di rizosfera, dove una piramide, alla cui sommità è la pianta ed alla base sono il suolo e i microrganismi, rappresenta lo stadio più complesso e dinamico.

La fisionomia ecologica della rizosfera è quella di un microhabitat o meglio di una somma di microhabitat, nei quali si verificano intensi processi metabolici secondo meccanismi di regolazione biochimica quanto mai delicati, esercitati dalla pianta sui microrganismi e viceversa.

Le proprietà fisiche, chimiche e biologiche di un tale biotopo sono peculiari.

Dal punto di vista fisico, la definizione di rizosfera quale « pane di terra riempito delle radici di una data pianta con i microrganismi che le accompagnano » (Thom e Smith, 1939) la delimita praticamente, attribuendole caratteristiche importanti per la struttura e la micromorfologia del suolo, la cui naturale eterogeneità subisce a livello radicale una sorta di attenuazione per diventare un che di continuo.

Nella rizosfera, infatti, le particelle del terreno aderiscono più o meno strettamente alle radici, dando luogo a fenomeni di aggregazione, di colonizzazione microbica e di stabilizzazione degli aggregati, che biofisicamente comportano problemi che, nella stessa metodologia di studio della microflora interessata, implicano trattamenti di scuotimento leggero o energico; lavaggi ripetuti, separazione delle varie frazioni, etc.

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 cm² 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 CO₂ prodotta dalle radici varia dal 30 al 50% della quantità totale e molta della CO₂ 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.

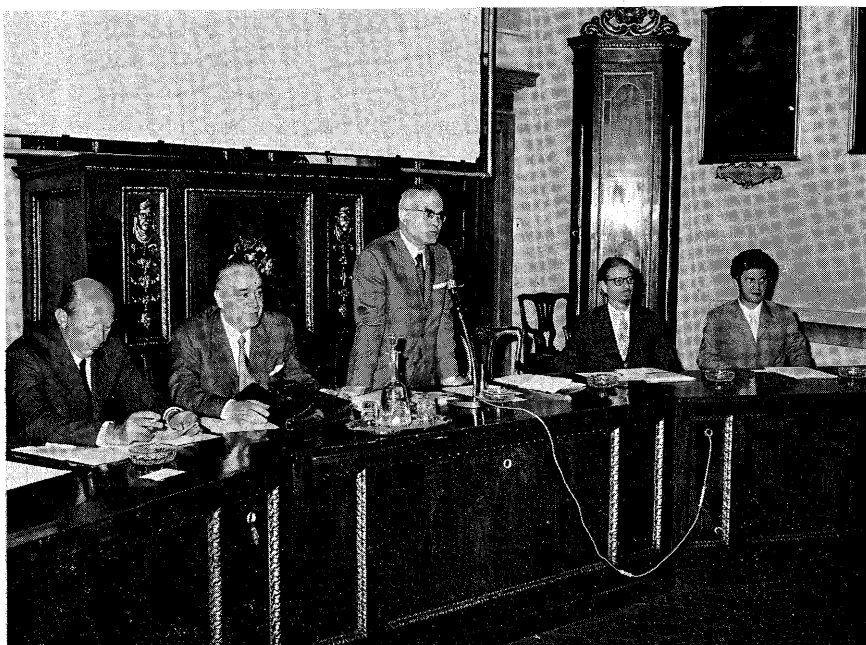
Se tutto ciò si verifica nel terreno, la rizosfera rappresenta al contrario un microhabitat attivo e dal punto di vista nutritivo relativamente pletorico.

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 m² 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 γ -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 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 B₁₂, 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_2 e la B_{12} (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 γ -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, autopatichiche 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 CO₂, NH₃ 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 O₂, 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 indrizzi 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'inse-diamento 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 CO₂ 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 CS₂ 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 β -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 B₁₂ 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 verificano 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 NO_3 , con alfanaftilamina acetato per NO_2 e reattivo di Nessler per 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 μ di larghezza per 0,6-2 μ 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-

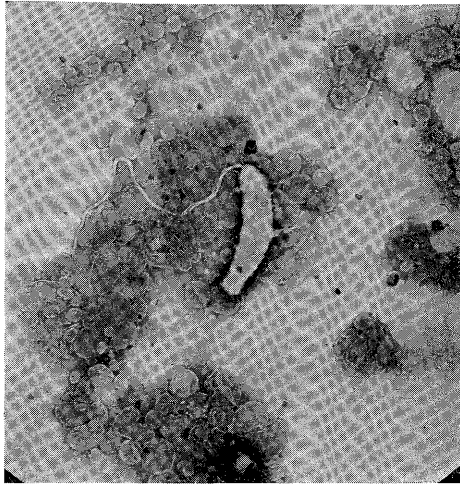


Fig. 1. — *Bdellovibrio bacteriovorus*.
28.000 X.

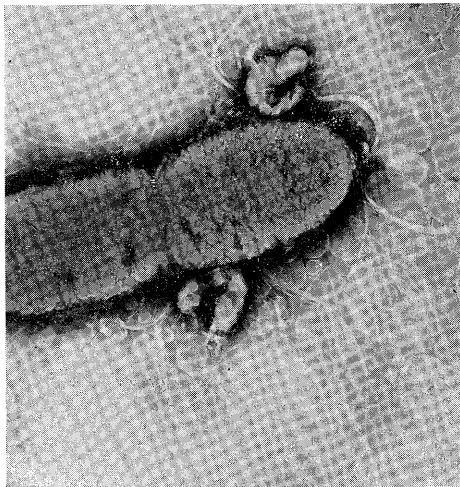


Fig. 2. — *Bdellovibrio bacteriovorus*
su *Serratia marcescens*. 28.000 X.

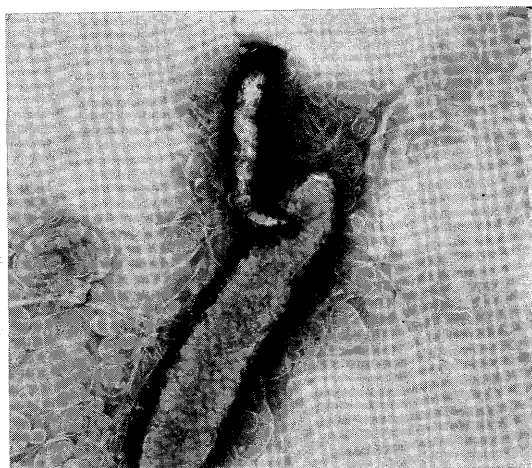


Fig. 3. — *Bdellovibrio bacteriovorus* su *Serratia marcescens*. 32.000 X.

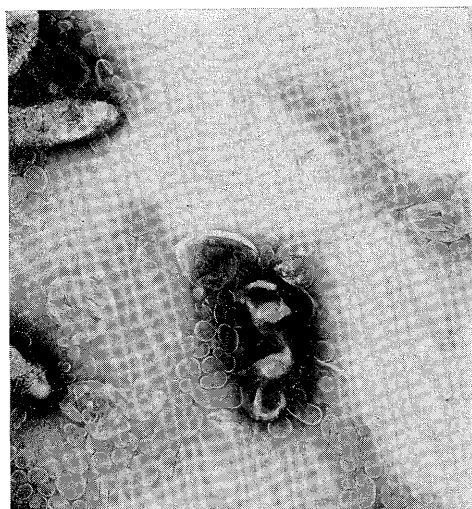


Fig. 4. — Spirale di *Bdellovibrio bacteriovorus* isolato da terra di Torrenieri su *Serratia marcescens*. 20.000 X.

brioni si trasformano in lunghe spirali, mentre aumenta notevolmente tra l'8^a e la 12^a 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 palusti, 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 HgCl₂ 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>Trichothecium 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-

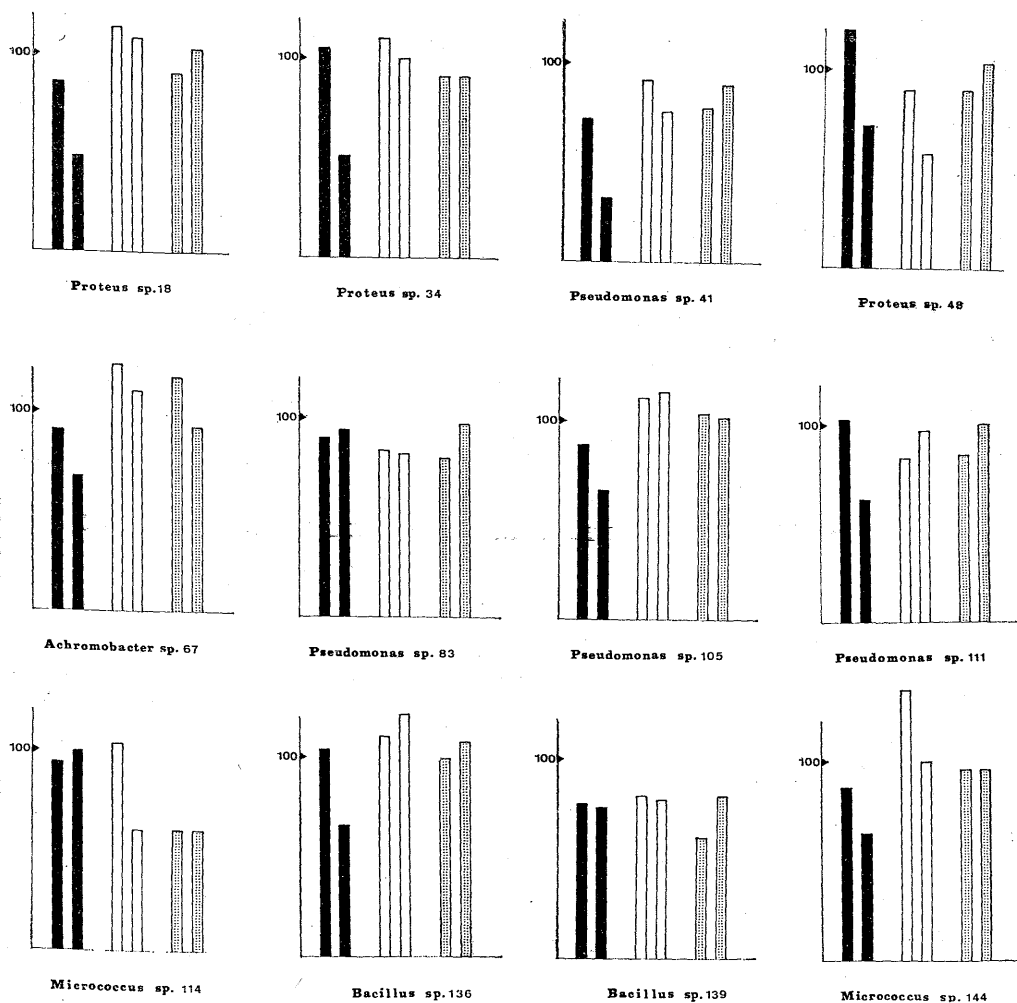


Fig. 1. - Responsi di accrescimento di ceppi batterici in presenza di fitotossine. Colonne piene: in presenza della sostanza II (sost. tannica); colonne bianche: in presenza della sostanza VII (derivato benzoico); colonne punteggiate: in presenza della sostanza VIII (derivato benzoico).

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 λ_{\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

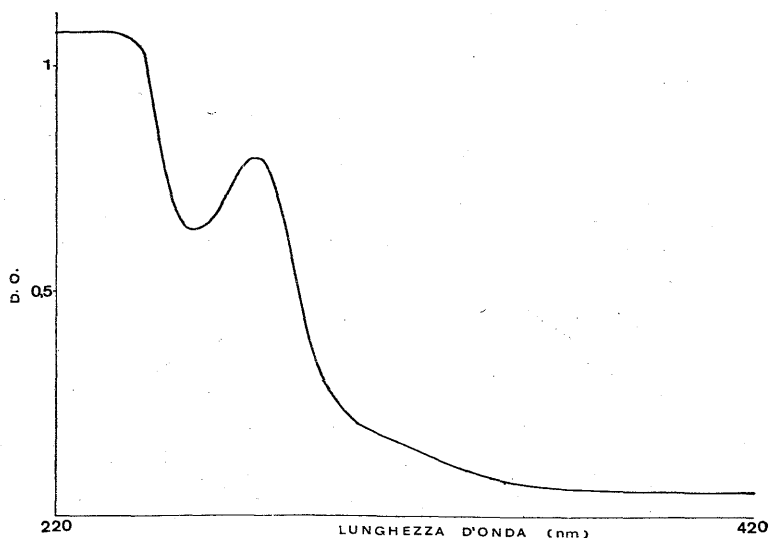


Fig. 2. - Spettro di assorbimento in etanolo dei tannini condensati presenti nell'estratto acquoso radicale di pesco.

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-

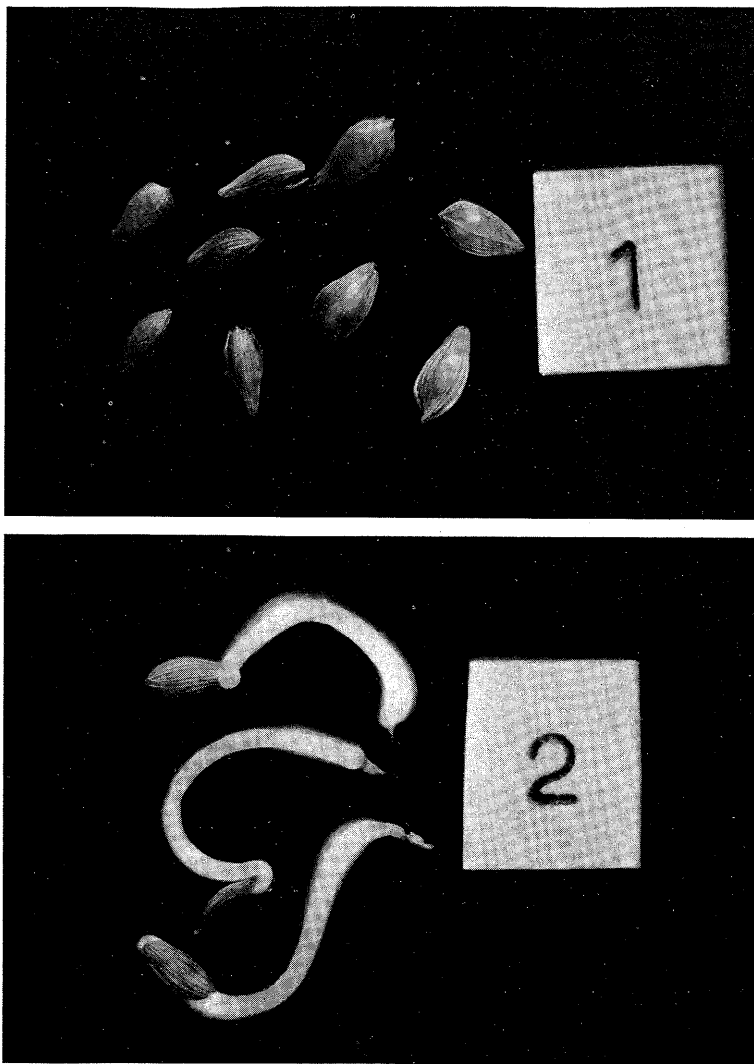


Fig. 3. - Effetto delle sostanze tanniche degli estratti radicali di pesco sulla germinazione dei semi di lattuga Trocadero.
1: frazione di tannini idrolizzabili; 2: frazione di tannini condensati.

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/m²).

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

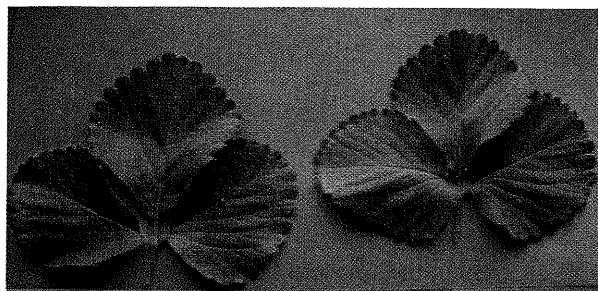
Un aspetto emerso dalle nostre ricerche, e che ci sembra opportuno definire in via preliminare, riguarda la localizzazione della microflora del sistema idroponico studiato. A tale riguardo abbiamo riscontrato che, mentre in partenza la carica microbica delle soluzioni e del supporto (costituito da selce 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.

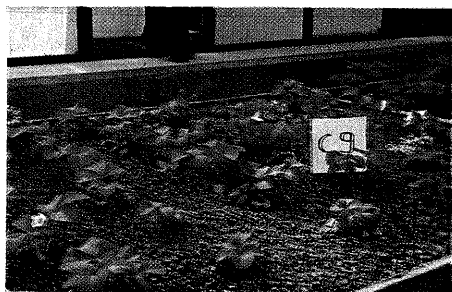
La localizzazione preferenziale dei microrganismi sul supporto, che trova una spiegazione nella ben nota tendenza di molte forme microbiche ad aderire a substrati solidi (MEADOWS, 1971), è un fatto di basilare importanza ai fini della scelta delle tecniche di studio della microflora dei sistemi idroponici e per una corretta comprensione del modo in cui si for-



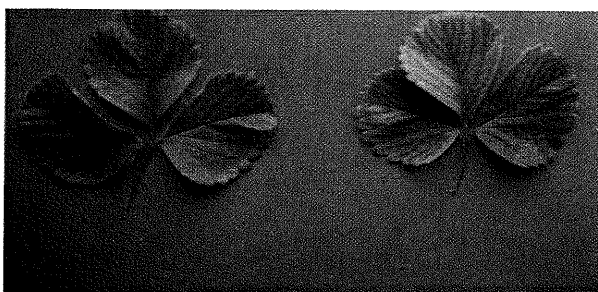
1



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 ⁽¹⁾	SU ⁽²⁾	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 ⁽³⁾	0	0	0	0,03	0,1	0,5

(¹) SN = Soluzione nutritiva.

(²) SU = supporto.

(³) 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 $\times 10^5$)⁽¹⁾.

	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

⁽¹⁾ 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 (0,2 μ g/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-

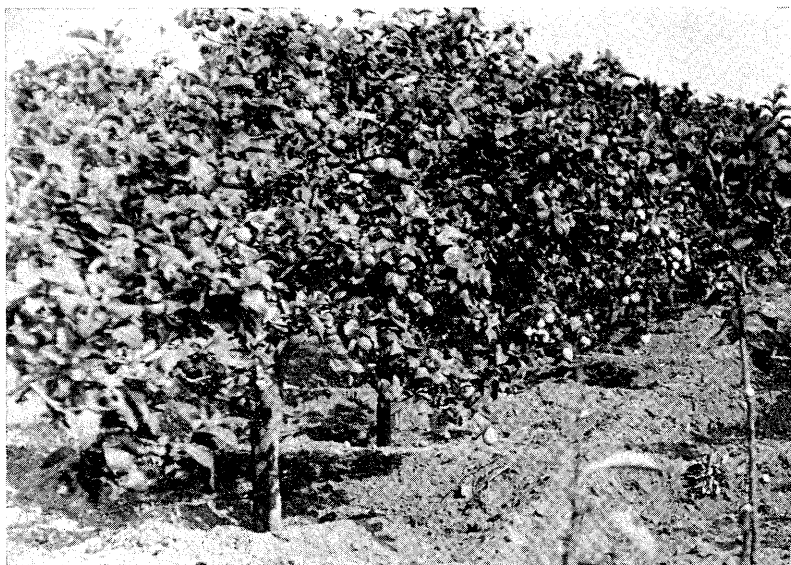


Fig. 1 — Veduta di alcune delle piante dai cui apparati radicali sono stati prelevati i campioni di suolo rizosferico.

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‰; P₂O₅ assimilabile 0,17‰; K₂O 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 ⁸)	Attinomiceti (x 10 ⁶)	Batteri (x 10 ⁶)
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 ⁸)	Attinomiceti (x 10 ⁶)	Batteri (x 10 ⁶)
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 ⁸)			Attinomiceti (x 10 ⁶)			Batteri (x 10 ⁶)		
	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*. 5ª Ed. Commonwealth. Mycological Institute. Kew, Surrey (1966).
- BOULARD B. e R. MOREAU — *Sol, microflore et végétation*. Masson et C editeurs. 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 N⁶-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.

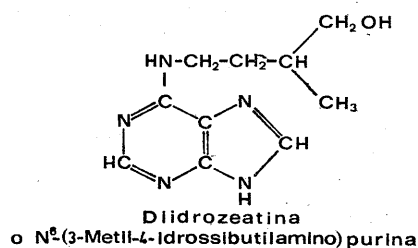
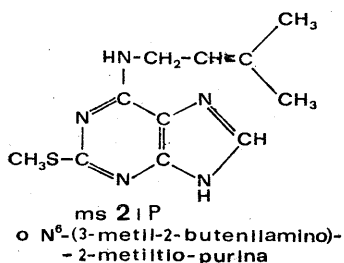
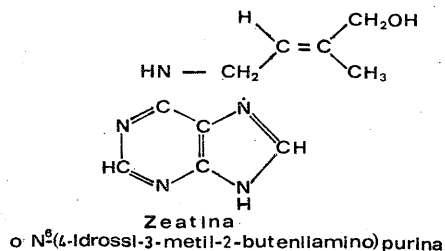
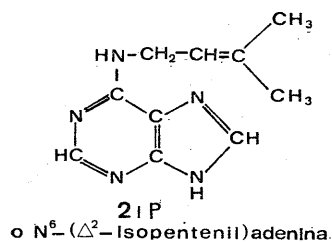
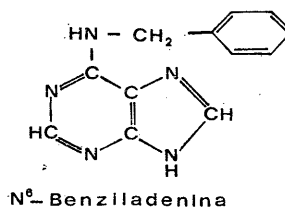
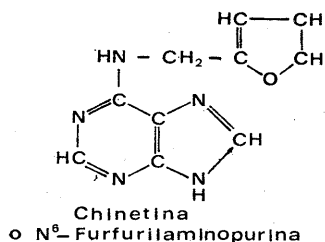


TAVOLA 2. — Specie microbiche da cui sono state isolate sostanze con attività citochinica.

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.

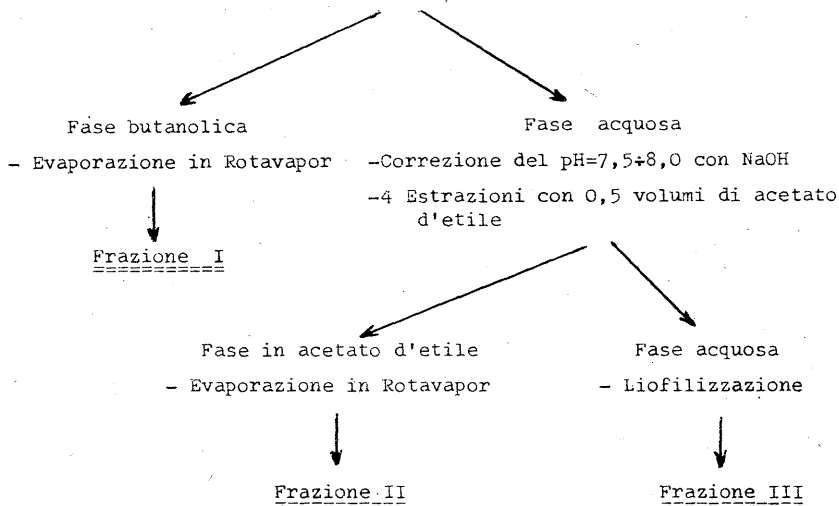
L'attività citochininica delle frazioni ottenute dagli estratti cellulari è stata saggiata col test « senescenza », come indicato da GUNNING e BARKLEY (1963), impiegando segmenti di foglie di avena immersi nelle soluzioni da saggiare variamente diluite ed inoltre, per confronto, in soluzioni a diverse concentrazioni ($10^{-4} \div 10^{-10}$ M) di una citochinina sintetica (la N⁶-benziladenina, prodotto « purissimo » della Fluka A G) e di una, invece, notoriamente diffusa in natura (la N⁶-Δ² 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 β -indolacetico, gibberellina A₃) 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 γ nella concentrazione $10^{-4}M$, 10 γ nella concentrazione $10^{-5}M$, 1 γ 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 γ di « equivalenti-isopenteniladenina » o 0,2 γ di « equivalenti-benziladenina » nella frazione butanolica (ricca in basi nucleiche) e, rispettivamente, 0,008 γ o 0,08 γ , 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 γ di « equivalenti-isopenteniladenina » o 0,03 γ

TAVOLA 4. — Risultati del test « senescenza ».

Campioni	D.O. _{.620} degli estratti clorofillici	Campioni	D.O. _{.620} degli estratti clorofillici
Controlli (H ₂ O)	0.135	Controlli (*)	0.130
6-BA 10 ⁻⁴ M	0.480	2iP 10 ⁻⁴ M	0.840
» 10 ⁻⁵ M	0.470	» 10 ⁻⁵ M	0.820
» 10 ⁻⁶ M	0.430	» 10 ⁻⁶ M	0.730
» 10 ⁻⁷ M	0.320	» 10 ⁻⁷ M	0.560
» 10 ⁻⁸ M	0.190	» 10 ⁻⁸ M	0.330
» 10 ⁻⁹ M	0.150	» 10 ⁻⁹ M	0.170
» 10 ⁻¹⁰ M	0.135	» 10 ⁻¹⁰ 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 (± 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 γ o 0,01 γ 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 N⁶-(Δ^2 -isopentenil) adenina; le 5 e 13, come N⁶-N⁶-dimetiladenina; la sostanza N° 11, come 1-metilguanina; le sostanze 8 e 16, come N⁶-(Δ^2 -isopentenil) adenosina; le n. 9 e n. 17, come N⁶-(Δ^2 -isopentenile)-2-

TAVOLA 5. — *Basi e nucleosidi minori evidenziati in Az. chroococcum e Bac. cereus mycoides.*

N.	R ₁ nel sistema di Playtys e Leonard	λλ _{max} (nm)			λ _{min} (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 N⁶-(Δ^2 -isopentenil) adenina ed il suo riboside, la N⁶-(Δ^2 -isopentenil)-2-metiltioadenosina ed anche la N⁶-N⁶-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 manicotto 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 cytokinique 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 N⁶-(Δ^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 N⁶-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.

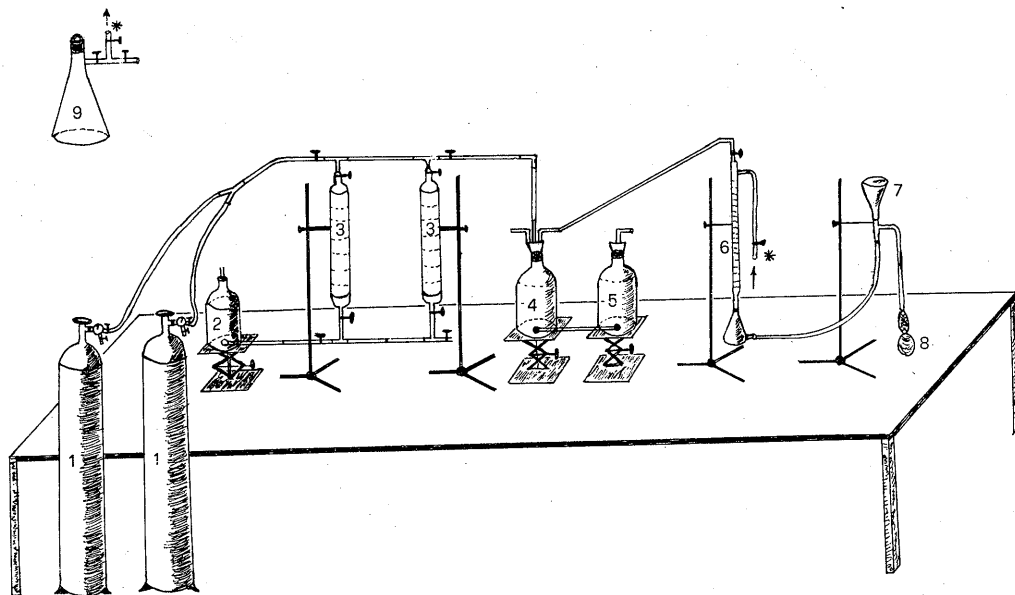
Dosaggio dell'etilene. — La determinazione dell'etilene è stata effettuata con un gas cromatografo Carlo Erba Fractovac CI 452 ad ionizzazione di fiamma. È stata usata una colonna in acciaio inossidabile della lunghezza di 150 cm. e del diametro interno di 2 mm. riempita di Porapak R; la temperatura 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_2H_4 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 μ 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).

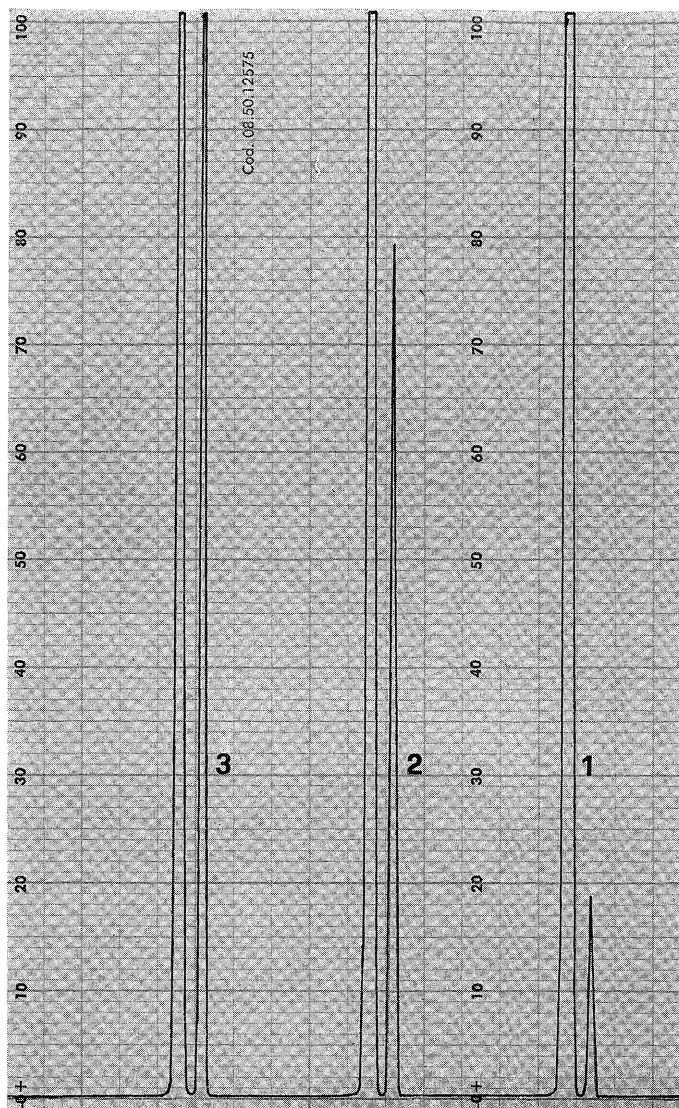


Fig. 2 - Gas cromatogrammi della miscela gassosa acetilene-etilene di un campione di terreno di rizosfera di graminacee incubato in atmosfera di Argon ed Ossigeno dopo 6 ore (1), 24 ore (2) e 48 ore (3).

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),

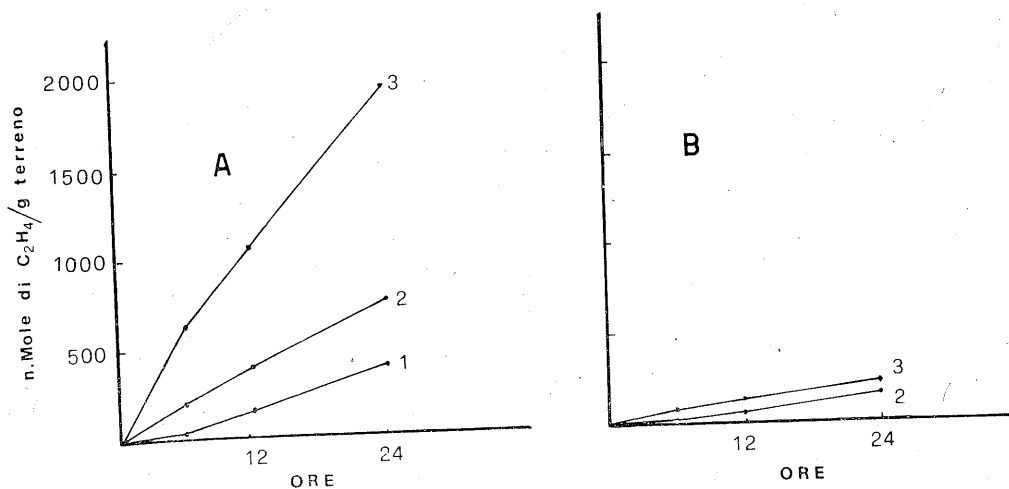


Fig. 3 - Produzione di etilene nella rizosfera di graminacee (A) e di medica + graminacee (B) dopo 15 (1), 40 (2) e 64 ore (3) di preincubazione.

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 ₂ H ₄ /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 ₂ H ₄ /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 N₂-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 N₂-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- β -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 β -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>	GAFFRON et al., 1935.
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	DOUDOROFF et al., 1959; MERRICK et al., 1961, 1965; BOATMAN, 19664.
<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.

β -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 m² 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- β -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 inocolata 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 λ , 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 CO₂ (100 ml di NaOH 20%) e, nella parte inferiore, con un recipiente contenente 200 ml di acqua, anch'esso collegato con una trappola per CO₂.

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 ¹⁴CO₂ 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 ¹⁴C 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, Me₂ 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 ¹⁴CO₂ 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 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 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/NH₄ (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 cm². 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.

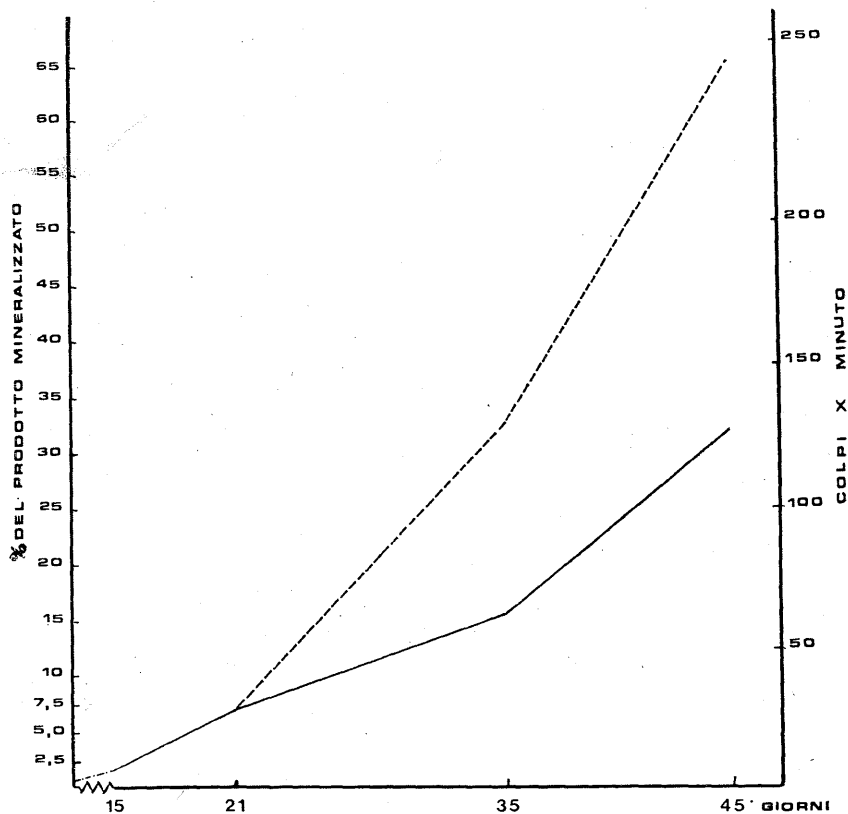


Fig. 1 - Cinetica dello sviluppo di $^{14}\text{CO}_2$ nei 45 giorni successivi all'aggiunta di poli- β -idrossibutirrato- ^{14}C al terreno, in condizioni naturali (linea tratteggiata) e con sterilizzazione del terreno all'inizio della prova (linea continua).

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

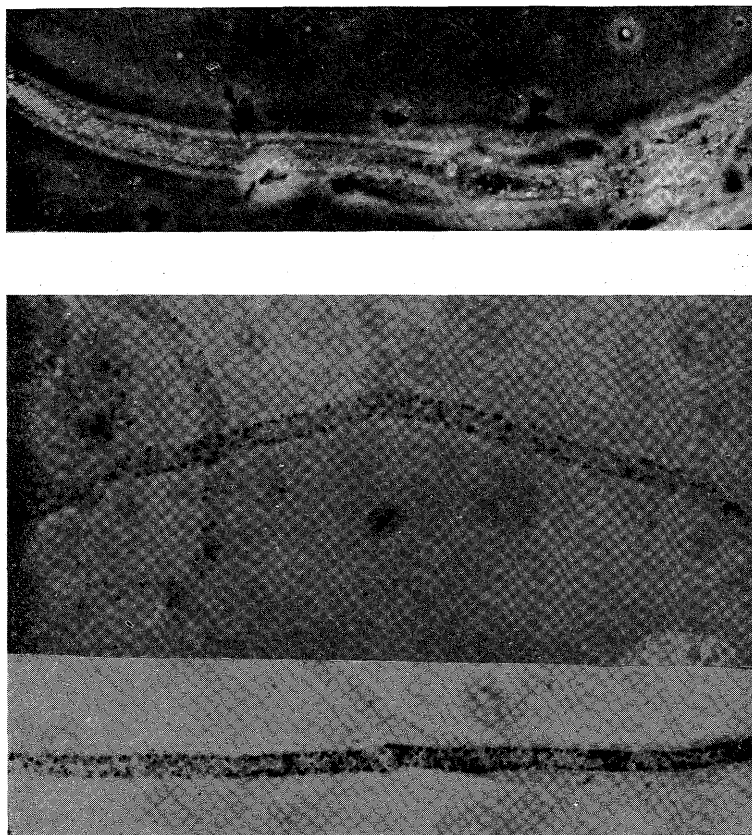


Fig. 2 - Autoradiografie di ife fungine dopo 5 giorni dall'inizio della prova (A) e dopo 7-10 giorni (B).

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.

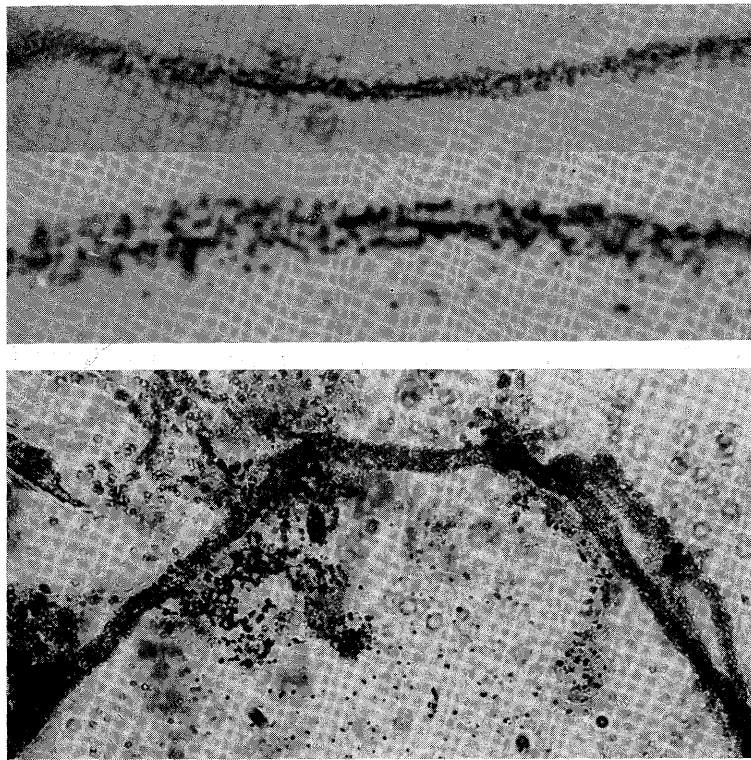


Fig. 3 - Autoradiografie di ife fungine dopo 15 giorni dall'inizio della prova (A) e dopo 20 giorni (B).

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- β -idrossibutirrato- ^{14}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- ^{14}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-

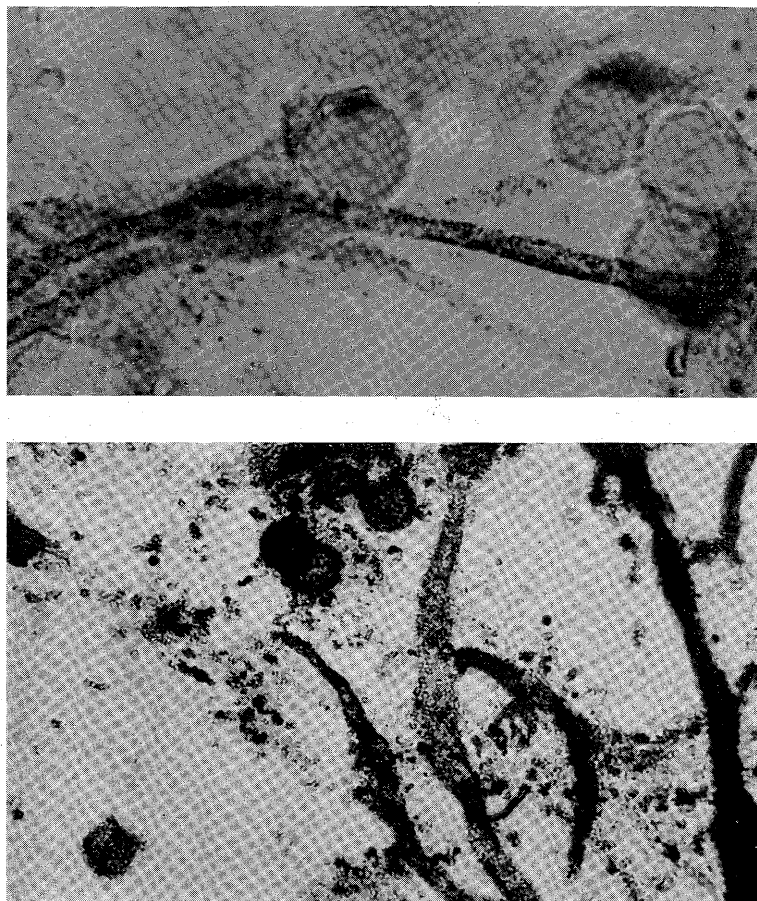


Fig. 5 - Autoradiografie di ife fungine e cellule algali dopo 7-10 giorni dall'inizio della prova (A) e dopo 45 giorni (B). Si noti la presenza di marcature sulle cellule algali solo dopo una incubazione protratta nel tempo.

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-

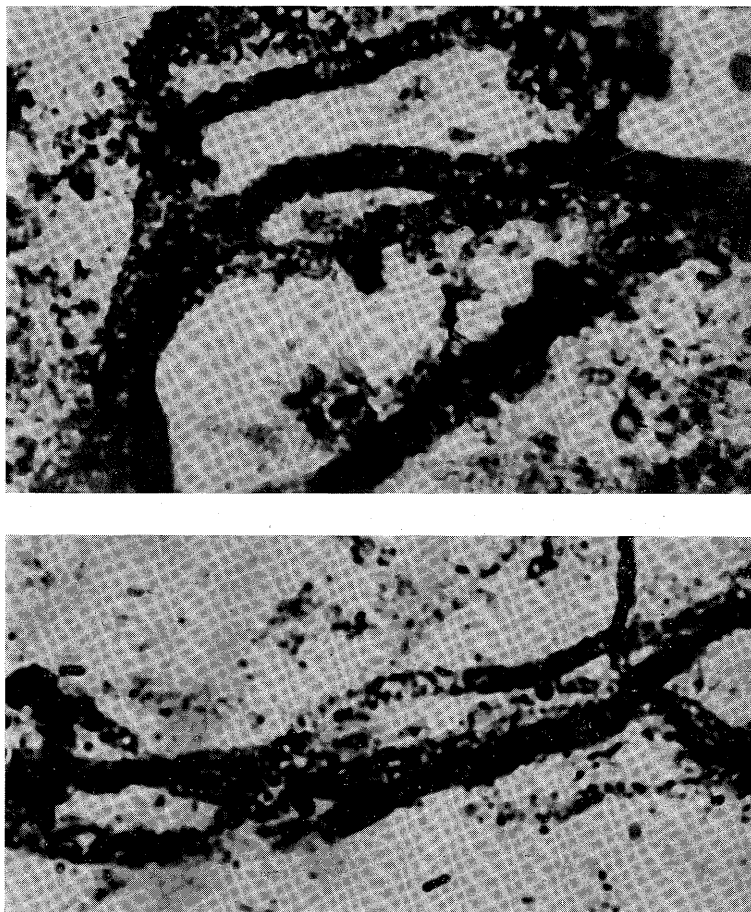


Fig. 4 - Autoradiografie di ife fungine dopo 45 giorni dall'inizio della prova in terreno senza piante (A) ed in presenza di piantine di grano (B).

reno e dell'acqua. La dinamica della mineralizzazione del PHB-¹⁴C differisce quindi da quella di altre sostanze dinamogene incorporate nel suolo: nel caso del glucosio-¹⁴C infatti si raggiunge il 76% di prodotto mineralizzato dopo 7 giorni (SIMONART e MAYAUDON, 1958); nel caso della glicina-¹⁴C 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}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}C hanno portato a risultati non molto diversi (SIMONART e MAYAUDON, 1958), mentre nel caso di incorporazione di glicina-1- ^{14}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}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-¹⁴C, 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-β-idrossibutirrato-¹⁴C accumulato da cellule di *Azotobacter chroococcum* Beij. Il composto era sintetizzato a partire dall'acetato-1-¹⁴C ed ottenuto puro ad un peso molecolare molto elevato.

Nelle condizioni realizzate il 65% circa della radioattività iniziale veniva rilasciata come ¹⁴CO₂ 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- β -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* cells has been studied in a soil-water ecosystem. The PHB- ^{14}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- β -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. — *β -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- β -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- β -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 β -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- β -hydroxybutyrate*. I. *Purification of native poly- β -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- β -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- β -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- β -hydroxybutyric acid*. J. Bacteriol., 82, 33.
- LEMOIGNE M., 1923. — *Production d'acide β -oxybutyrique par certaines bactéries du group du B. subtilis*. C. R. Acad. Sci., Paris, 176, 1761.
- LEMOIGNE M., 1964. — *Fermentation β -hydroxybutyrique*. Helv. Chim. Acta, 29, 1303.
- LEMOIGNE M., GIRARD H., 1943. — *Reserves lipidiques β -hydroxybutyriques chez Azotobacter chroococcum*. C.R. Acad. Sci., Paris, 217, 577.
- LEMOIGNE M., GRELET N., CROSON M., LE TERIS M., 1945. — *Formation de lipide β -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- β -hydroxybutyric acid in Pseudomonas pseudomallei*. J. Bacteriol., 79, 395.
- LUNDGREN D.G., ALPER R., SCHNAITMAN C., MARCHESSAULT R.H., 1965. — *Characterization of poly- β -hydroxybutyrate extracted from different bacteria*. Bacteriol., 89, 245.
- LUSTY C.J., DOUDOROFF M., 1966. — *Poly- β -hydroxybutyrate depolymerases of Pseudomonas lemoignei*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 56, 960.
- MACRAE R.M., WILKINSON J.F., 1958. — *Poly- β -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}C dans le sol*. Annales Inst. Pasteur, 118, 191.
- MAYAUDON J., SIMONART P., 1963. — *Humification des microorganismes marqués par ^{14}C dans le sol*. Annales Ins. Pasteur, 105, 257.
- MAYAUDON J., SIMONART P., 1965. — *Metabolisme de la glycine ^{14}C dans le sol*. Annales Inst. Pasteur, 109, 224.
- MERRICK J.M., DOUDOROFF M., 1961. — *Enzymatic synthesis of poly- β -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 β -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- β -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- β -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^a 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- β -hydroxybuttersäure, ihre verbreitung, funktion und biosynthese.* Angew. Chem., 74, 342.
- SCHLEGEL H.G., GOTTSCHALK G., von BARTHA R., 1961. — *Formation and utilization of poly- β -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- β -hydroxybutyrate synthesis in Azotobacter beijerinckii.* Biochem. J., 123, 29P.
- SIERRA G., GIBBONS N.E., 1962. — *Role and oxydation pathway of poly- β -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 CO₂ de divers substrats radioactifs.* Plant and Soil, 9, 367.
- SLEPECKI R.A., LAW J.H., 1960. — *The role of poly- β -hydroxybutyric acid in the sporulation of Bacillus megatherium.* Bacteriol. Proc., 1960, 64.
- SLEPECKI R.A., LAW J.H., 1961. — *Synthesis and degradation of poly- β -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- β -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- β -hydroxybutyrate in survival of Sphaerotilus discophorus during starvation.* Can. J. Microbiol., 14, 785.
- TOBBACK P., LAUDELOUT H., 1965. — *Poly- β -hydroxybutyric acid in Nitrobacter.* Biochim. Biophys. Acta, 97, 589.

- VAN EOOI 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- β -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 β -oxydation in the metabolism of saturated aliphatic hydrocarbons by soil Nocardias*. The Macaulay Ins. for Soil Res., Aberdeen.
- WILLIAMSON D.H., WILKINSON J.F., 1958. — *The isolation and estimation of the poly- β -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 B₁₂
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 B₂ e B₁₂. 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 B₁₂ che è un carattere importante nella definizione delle attività biochimiche dei rizobi. La determinazione della B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ medium Difco), le modalità di semina dell'organismo test e dell'incubazione, effettuata in cella termoluminostatica.

Confrontando i due metodi di determinazione della vitamina B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂ ha oscillato tra 2,6 e 21,5 µg/g di sostanza secca.

In conclusione, le forti oscillazioni riscontrate nel contenuto di vitamina B₁₂ 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 B₁₂.

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 B₁₂. Data l'assenza di correlazione fra produzione di vitamina B₁₂ ed efficacia, è evidente che l'attitudine a produrre vitamina non ha influenza alcuna (almeno per quanto riguarda la vit. B₁₂) sulle proprietà simbiotiche dei rizobi.

SUMMARY

It has been shown that effective strains of *Rhizobium* spp. vary widely in their ability to synthesize vitamin B₁₂.

Since the amount of vitamin B₁₂ produced by the strains examined is not related to their effectiveness, it is evident that vitamin production (at least with regard to vit. B₁₂) 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 B₁₂*. 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 PETERKOFKY, 1971; ROUSSAUX e HEIM, 1971), al punto che oggi, se si può dare per certo il tRNA come sito della sintesi delle citochinine (PETERKOFKY, 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 β -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 γ 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 N⁶-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 N⁶-Benziladenina sono state impiegate come prodotti della Fluka AG; come N⁶-(Δ^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- γ , γ -dimetilalliladenina della Sigma Chem. Co.; N⁶-(Δ^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, inviataci 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.), inviataci 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°C per *Clostridium thermocellum*; a 37°C per *E. coli* e per *Mycoplasma sp.* (Kid.); a 28°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 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 N^6 -(Δ^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 N⁶-(Δ^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 10⁻⁶ M. Esso non si sviluppa

Tav. 1. — D.O.₆₀₅ 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 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Adenina	0,143	0,127	0,097	0,097	0,096
Chinetina	0,070	0,325	0,090	0,083	0,073
N ⁶ -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

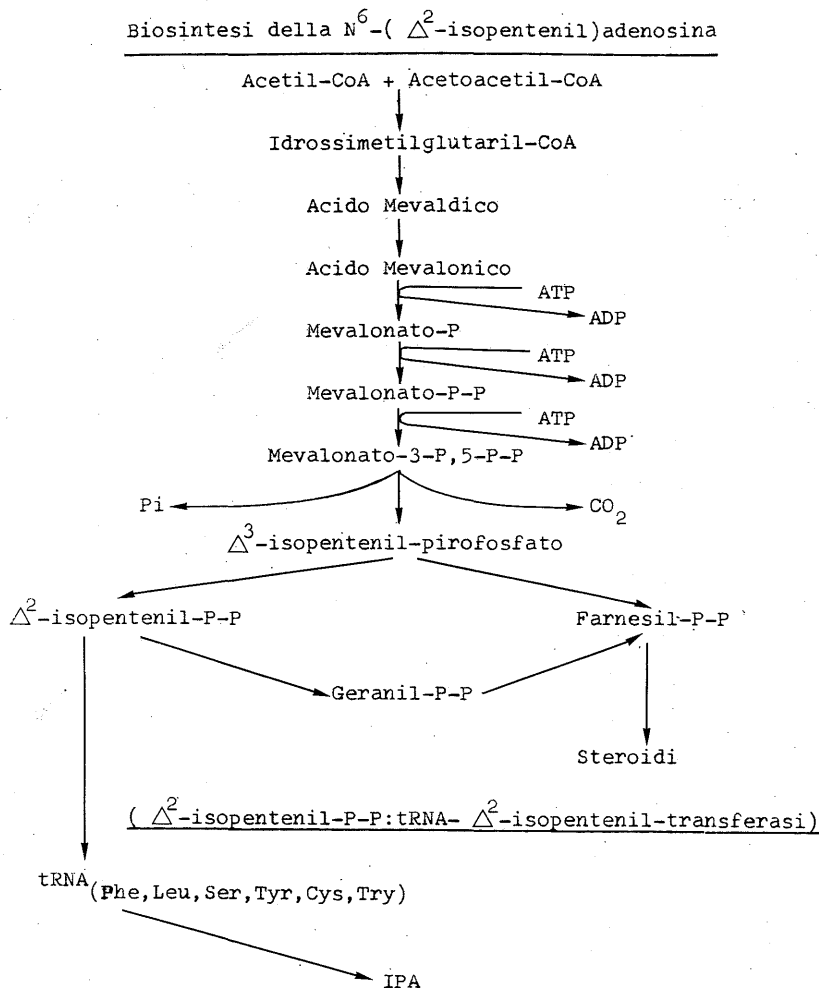
in substrati sintetici e meno complessi di quello impiegato, nei quali il responso delle citochinine apparirebbe, molto probabilmente, accentuato.

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, NH_4NO_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⁻ 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 PETERKOFISKY (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 Δ^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 Δ^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 N⁶-(Δ^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 T₄ (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 N⁶-(Δ²-isopentenil) adenina sulla crescita di *E. coli* B/b.

D.O. ₆₀₅ delle colture in « M 9 salts medium » dopo 2h 30'				
Geraniolo 2 mg%		0,973	Farnesolo 2 mg%	1,000
»	+2iP 10 ⁻⁷ M	1,580	»	+2iP 10 ⁻⁷ M 1,600
»	+2iP 10 ⁻⁶ M	1,900	»	+2iP 10 ⁻⁶ M 1,950
Geraniolo 5 mg%		0,871	Farnesolo 5 mg%	0,795
»	+2iP 10 ⁻⁷ M	1,445	»	+2iP 10 ⁻⁷ M 1,570
»	+2iP 10 ⁻⁶ M	1,850	»	+2iP 10 ⁻⁶ M 1,900
Geraniolo 10 mg%		0,736	Farnesolo 10 mg%	0,520
»	+2iP 10 ⁻⁷ M	1,350	»	+2iP 10 ⁻⁷ M 1,330
»	+2iP 10 ⁻⁶ M	1,800	»	+2iP 10 ⁻⁶ M 1,730
Geraniolo 2 mg%			Farnesolo 2 mg%	
+ Adenina 10 ⁻⁶ M			+ Adenina 10 ⁻⁶ M	0,990
Geraniolo 5 mg%			Farnesolo 5 mg%	
+ Adenina 10 ⁻⁶ M			+ Adenina 10 ⁻⁶ M	0,810
		Controllo:	1,140 + 0,010	
		2iP 10 ⁻⁷ M:	1,145 + 0,015	
		2iP 10 ⁻⁶ 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 10⁻⁷ 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 N⁶-(²Δ-isopentenil) adenina 10⁻⁷M sulla replicazione del colifago T₄ (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. 10⁻⁸ 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. 10⁻⁷M). 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 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
	Concentrazioni (M)				
Adenina	77	84	89	96	98
Chinetina	92	126	113	103	99
N ⁶ -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 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Adenina	80	100	100	100	100
Chinetina	60	70	260	110	100
N ⁶ -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 N⁶-benziladenina) e naturali (N⁶-(Δ²-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 N⁶-benzyladenine) and natural (N⁶-(Δ²-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 -(Δ^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 -(Δ^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 -(γ , γ -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) — *N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenosine. Biosynthesis in tRNA in vitro*. *Biochem.*, 8, 4661.
- LITWACK M.D. e A. PETERKOFKY (1971) — *Transfer Ribonucleic acid deficient in N⁶-(Δ^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 N⁶-(Δ^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 Δ^3 , Δ^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 CaSO_4 a temperatura non superiore a 20°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 MgSO_4 , 1 meq/l di KH_2PO_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°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 microrganismi 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	+ 10 p.p.m.	+ 20 p.p.m.	+ 30 p.p.m.
	2,4,5-TP	2,4,5-TP	2,4,5-TP	2,4,5-TP
NH ₄ ⁺ (0,4 meq/l)	4.397	15.611	1.204	693
NO ₃ ⁻ (0,4 meq/l)	1.168	2.204	3.370	1.004

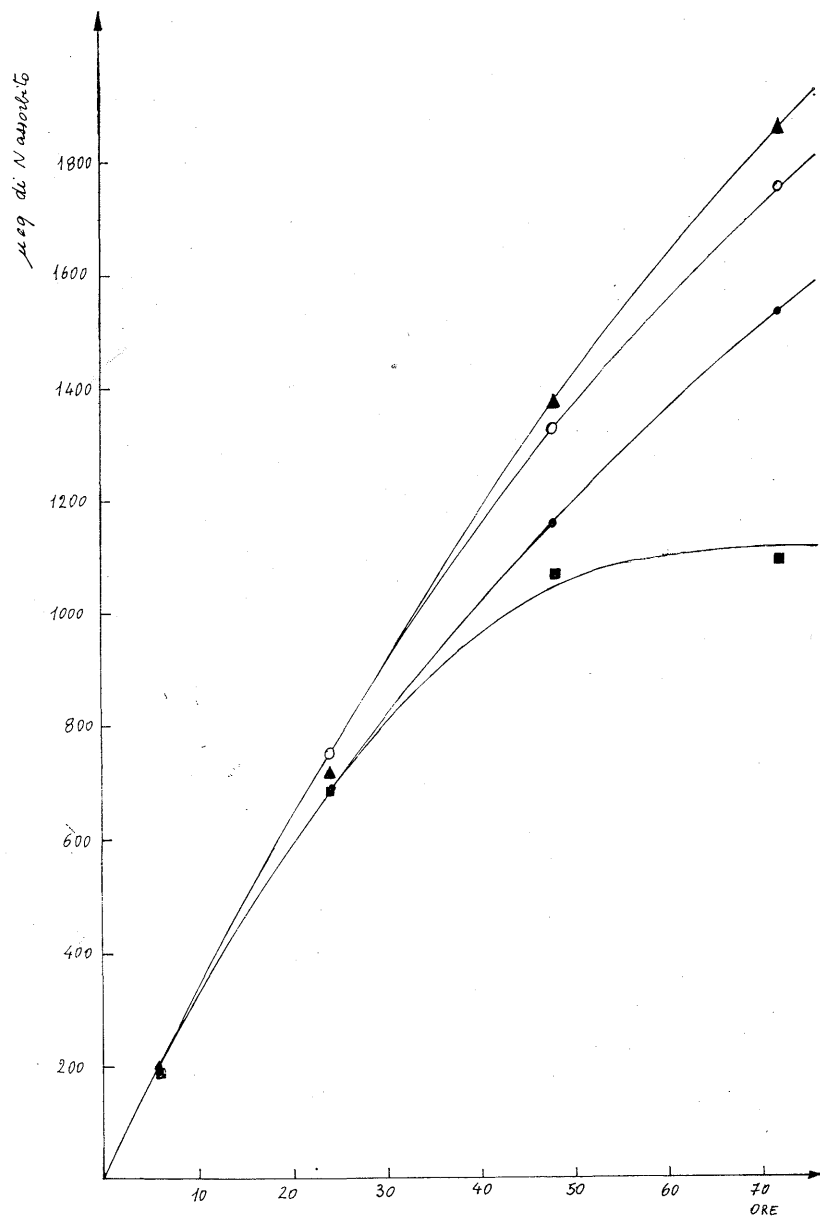


Fig. 1 - Azoto assorbito sotto forma di NH_4^+ in funzione del tempo. —●—●— senza 2,4,5-TP; —○—○— con 10 p.p.m. di 2,4,5-TP; —▲—▲— con 20 p.p.m di 2,4,5-TP; —■—■— con 30 p.p.m di 2,4,5-TP.

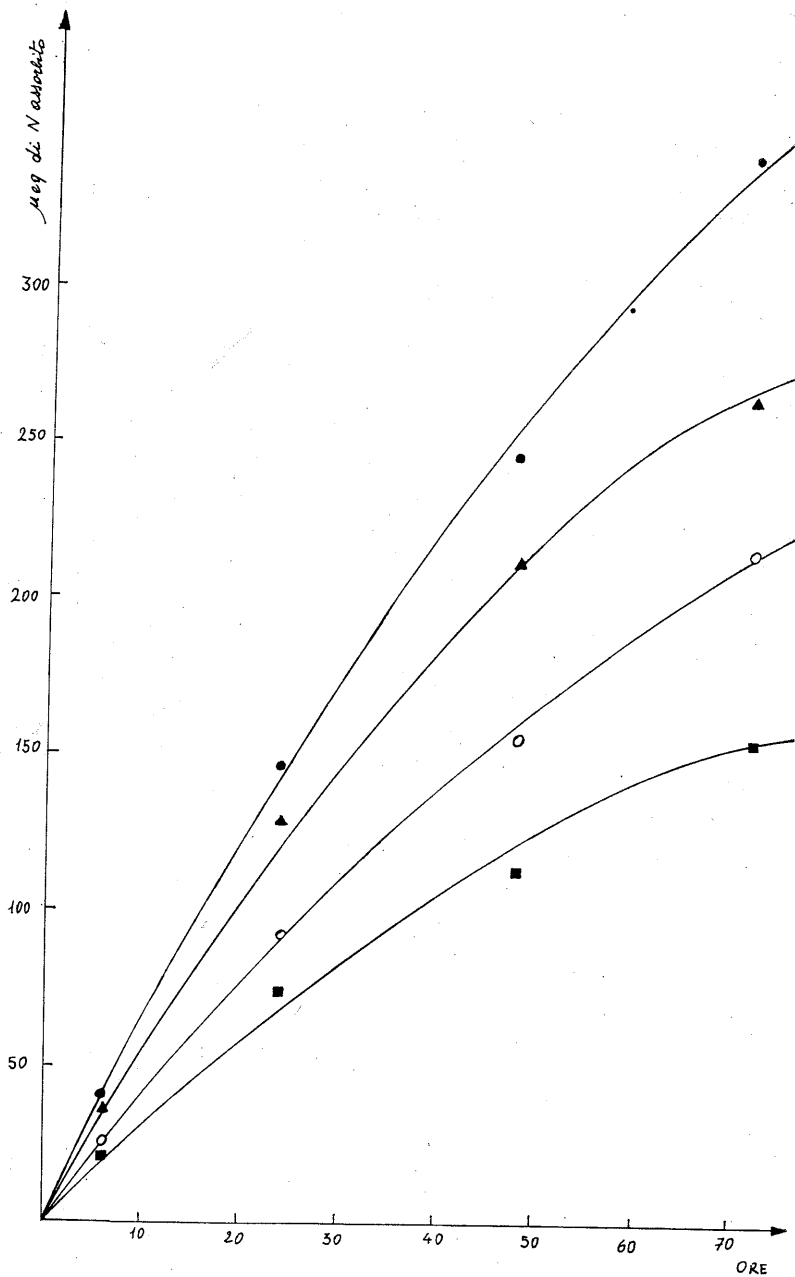


Fig. 2 - Azoto assorbito sotto forma di NO_3^- in funzione del tempo. —●—●— senza 2,4,5-TP; —○—○— con 10 p.p.m. di 2,4,5-TP; —△—△— con 20 p.p.m. di 2,4,5-TP; —■—■— con 30 p.p.m. di 2,4,5-TP.

della popolazione microbica con un concomitante aumento dello assorbimento dello ione 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 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 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 B₁₂ o di sostanze B₁₂ simili, i risultati riferiti potrebbero avere anche un'altro interesse. È noto, infatti, che nel caso di Streptomiceti la produzione di B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂-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 B₁₂ 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 B₁₂ 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 B₁₂. *Euglena gracilis* ceppo Z è più specifico di *Escherichia coli*, poiché mentre l'alga risponde solo ad alcune cobalamine (che derivano dalla vitamina B₁₂ 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 B₁₂.

Per quanto riguarda, infine, la possibilità di discriminare per via biologica la vitamina B₁₂ dalle sostanze B₁₂-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. B₁₂ e poche altre cobalamine, con microrganismi dotati di minore specificità di responso, quali *E. coli*, oltre alla B₁₂ si svela la presenza di un numero variabile di altre sostanze B₁₂-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-β-idrosibutirrato nel terreno e nella rizosfera</i>	» 209
W. BALLONI, D. RICCI - <i>Produzione di vitamina B₁₂ 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