

Società Italiana della Scienza del Suolo
Commissione III

Centro di studio dei microrganismi autotrofi del C.N.R.
e/o Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica
Università degli studi - Firenze

INDIRIZZI BIOTECNOLOGICI IN MICROBIOLOGIA DEL TERRENO

Atti del colloquio

su

BIOTECNOLOGIA DEL SUOLO

(a cura di W. BALIARDI)

Pubblicati con il contributo della
Cassa di Risparmio di Firenze

Aula Magna Facoltà di Agraria - Università
Piazzale delle Cascine, 18

FIRENZE - 11 Dicembre, 1984

E DIFESA SUOLO

STUDIO	
Misc.	1884
	Siss
	15
ISTITUTO SPERIMENTALE	E DIFESA SUOLO
FIRENZE	

Società Italiana della Scienza del Suolo
Commissione III

Centro di studio dei microrganismi autotrofi del C.N.R.
c/o Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica
Università degli studi - Firenze

INDIRIZZI BIOTECNOLOGICI IN MICROBIOLOGIA DEL TERRENO

Atti del colloquio

su

« BIOTECNOLOGIA DEL SUOLO »

(a cura di W. BALLONI)

Publicati con un contributo della
Cassa di Risparmio di Firenze

ISTITUTO SPERIMENTALE PER LO STUDIO E LA DIFESA DEL SUOLO	
Inventario N.	
Collocazione:	N 146

Aula Magna Facoltà di Agraria - Università
Piazzale delle Cascine, 18

FIRENZE - 11 Dicembre, 1984

Comitato Organizzatore:

Prof. W. BALLONI
Prof. F. FAVILLI
Prof.ssa A.M. FERRARI
Prof. G. FLORENZANO
Prof. G. PICCI

Segreteria:

Istituto di Microbiologia agraria e tecnica
Piazzale delle Cascine, 27
50144 Firenze
Tel. (055) 352051/360506

Si ringraziano le Ditte BECKMAN ANALYTICAL S.p.A. (MI) - e SILIMET S.r.l. (MO)

INDICE

Seduta antimeridiana

- G. FLORENZANO — Significato, possibilità e limiti della biotecnologia del suolo. Pag. 7
- G. PICCI, C. FILIPPI, G. BAGNOLI — L'antagonismo microbico nel terreno e sue possibili applicazioni nel controllo di fitopatie. Un triennio di ricerche. » 15
- C. SORLINI, G. RAMALLI, A. FERRARI, V. TRECCANI — La digestione anaerobica delle deiezioni animali come processo per la produzione di biogas e di fertilizzanti. » 29
- M. VINCENZINI, F. BOCCI, R. MATERASSI — Sulla determinazione in vitro ed in vivo della efficienza azotofissatrice dei cianobatteri eterocistati » 35
- L. TOMASELLI, C. SILI, L. GIOVANNETTI, E. PELOSI — Preparazione ed uso degli inoculanti cianobatterici nel suolo ed in risaia » 43
- L. GOLDBERG FEDERICO, A. FARINI, M.V. VANDONI — Influenza degli inibitori di nitrificazione sulla mineralizzazione del carbonio e dell'azoto nel suolo. » 57
- P. CRESCENZI, F. LONGOBARDI, J. SHEJBAL, R. VIGNOLA, F. VITALI — Regolazione dell'attività nitrificante del suolo. » 65

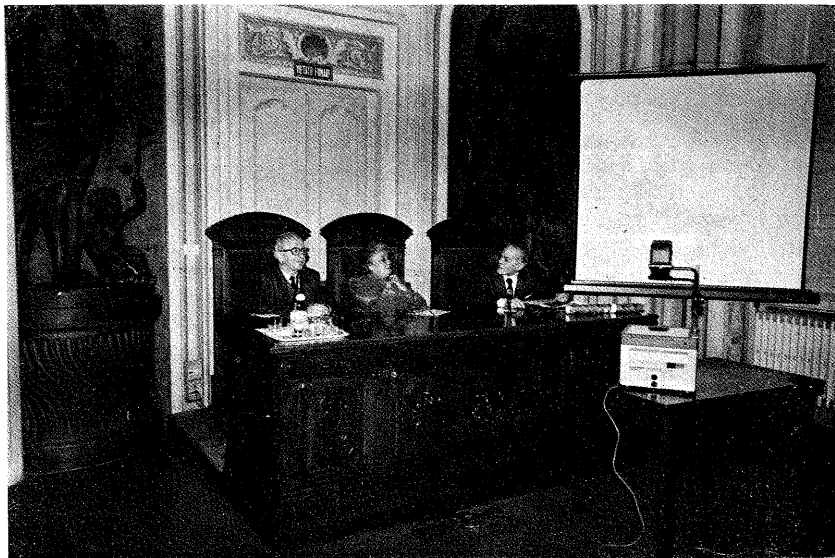
Seduta pomeridiana

- F. FAVILLI, W. BALLONI, A. MESSINI — Metodi di batterizzazione con *Azospirillum* spp. di colture cerealicole. Pag. 83
- M.C. MARGHERI, M.R. TREDICI, G. FLORENZANO — Gli attinomiceti del gen. *Frankia*: metodi di isolamento e d'inoculazione » 99
- E. CRESTA, F. FAVILLI — Co-coltura di *Cellulomonas-Azospirillum* » 113

M. GIOVANNETTI — Produzione di inoculo micorrizico e sua utilizzazione	Pag. 121
L. AVIO, M. GIOVANNETTI — Effetti di quantità crescenti di fosforo e di inoculo sullo sviluppo della infezione micor- rizica.	» 131
M. VINCENZINI, M.C. MARGHERI, P. CARLOZZI, B. PUSHPARAJ, G. TORZILLO, W. BALLONI — La coltura di <i>Azolla</i> in con- sociazione con il riso o in coltura massiva intercalare.	» 137
Elenco dei partecipanti al colloquio.	» 151
Indice degli autori.	» 157

In apertura il Preside della Facoltà Agraria e Forestale, Prof. Ugo Sorbi, si è congratulato con i partecipanti per l'importanza attuale, sia a livello di ricerca che applicativo, dei temi del Colloquio ed ha rivolto un caloroso saluto e l'augurio di proficuo ed intenso lavoro.

Il Presidente della SISS, Prof. Linda Federico Goldberg, ha ringraziato il Preside per l'ospitalità nella prestigiosa Aula Magna e la Commissione Biologia del Suolo per aver organizzato il Colloquio.



Il preside della Facoltà Agraria e Forestale Prof. Ugo Sorbi rivolge un saluto ai partecipanti al colloquio.

SIGNIFICATO, POSSIBILITÀ E LIMITI DELLA BIOTECNOLOGIA DEL SUOLO

G. FLORENZANO

Presidente Commissione Biologia della SISS.
Istituto di Microbiologia agraria e tecnica - Università, Firenze.

RIASSUNTO

La biotecnologia, che ha assunto un'importanza crescente nei vari campi delle scienze biologiche, come dimostrano i progressi spettacolari dell'ingegneria genetica, può anche in agricoltura rappresentare uno strumento efficace per aumentare la disponibilità delle risorse agricole e la qualità e quantità dei prodotti. Siccome il terreno rappresenta il fondamento dell'agricoltura, gli interventi biotecnologici derivanti dal progresso della ricerca scientifica, soprattutto nel campo dell'ecologia microbica e della microbiologia del suolo, possono concorrere con il ricorso allo sfruttamento dei microrganismi del suolo e delle loro attività, a diminuire i consumi di fertilizzanti, di pesticidi, diserbanti ecc., ed a migliorare la produttività agricola e forestale.

Le principali applicazioni riguardano, allo stato dell'arte, l'azotofissazione nelle non-leguminose, il controllo dei fitopatogeni, la lotta all'inquinamento e il riciclo dei residui e scarti agricoli.

Mentre si delineano in campo internazionale prospettive di commercializzazione di *Azospirillum* come biofertilizzante, di *Trichoderma* come antagonista di fitopatogeni e dei micoinsetticidi, altre iniziative biotecnologiche che interessano il suolo richiedono l'interazione di più discipline e la considerazione attenta dei requisiti ecologici richiesti ai microrganismi del suolo, che per l'impiego efficace devono superare limiti biologici e fisici.

SUMMARY

Biotechnology has become a very important branch of biological sciences and it can play a prominent role for a more efficient exploitation of agricultural resources and for increasing yield and quality of agricultural crops. Since soils is the basis of agriculture, biotechnological measures, based on modern knowledges of microbial ecology and soil microbiology, can lead to a better exploitation of the soil microflora and a lesser consumption of agricultural chemicals.

At the present state of knowledges the main applications relate to nitrogen fixation in non-legumes, control of phytophathogens, pollution control and waste recycling.

While some process are ready for commercial exploitations (i.e. *Azospirillum* as biofertilizers, *Trichoderma* as antagonist of phytopathogens and several micoinsecticides),

other biotechnological measures concerning soil microorganisms require additional research aimed at evaluating the ecological and physical constraints that can limit the efficiency of the organism employed.

Introduzione

La biotecnologia è destinata a diventare sempre più importante. Lo sviluppo di essa può aumentare la disponibilità delle risorse naturali, la qualità e varietà dei prodotti biologici adatti all'impiego agricolo, può migliorare la salute dell'uomo e degli animali ed esercitare una grande influenza sull'economia.

Mentre le linee d'influenza del trasferimento delle nuove tecnologie appaiono ben diseguate, si tratta di non restringerne gli usi meravigliosi alla biologia industriale, ma anche alla microbiologia del terreno non convenzionale che diventi biotecnologia. La biotecnologia del suolo si propone una sintesi unitaria e coerente delle possibili applicazioni delle attività microbiche per aumentare la fertilità del terreno e la produttività agricola. L'applicazione dei microrganismi del terreno e dei loro processi metabolici per ottimizzare la produttività agricola richiede conoscenze fondamentali di ecologia microbica e di microbiologia del suolo.

Dal punto di vista dell'ecologia microbica del suolo, che è interessata alla fisiologia delle popolazioni microbiche naturali, devono essere affrontati problemi differenti da quelli del fisiologo che lavora sulla regolazione delle attività metaboliche in colture di laboratorio. Il fisiologo può studiare il proprio sistema perturbando sia fisiologicamente che geneticamente i microrganismi per produrre un responso esagerato che è relativamente facile da misurare.

I microrganismi del terreno regolano normalmente le attività metaboliche integrandone l'input da molti differenti fattori ecologici.

Per capire lo stato fisiologico delle popolazioni microbiche naturali, l'ecologo dei microrganismi del suolo deve non solo determinare quali fattori influenzano le attività microbiche, ma anche come tali fattori interagiscono, quando più di uno si trova a livello limitante. Perciò i requisiti ecologici dovrebbero avere la priorità sulle funzioni metaboliche.

Dal punto di vista dell'ingegneria genetica, che rappresenta solitamente uno dei maggiori componenti della biotecnologia, essa ha molto da offrire nello sforzo di creare nuovi mezzi efficaci di miglioramento della fertilità del terreno e della crescita delle piante, ma si devono superare limiti biologici e fisici nell'impiego di ogni microrganismo. Nessun genotipo creato dall'uomo ha causato danni, ma i genotipi che sorgono spontaneamente in natura hanno talvolta effetti deleteri.

I fertilizzanti batterici

Dal punto di vista della Microbiologia del terreno, non si può dire che la causa della fertilità sia stata favorita dai preparati miracolistici messi in commercio o di quelli impiegati sotto il nome di « fertilizzanti batterici », in Unione Sovietica fin dalla seconda metà degli anni '20 su milioni di ettari.

Il presunto ruolo di fissare l'azoto e solubilizzare i fosfati di tali preparati batterici si dimostrò inconsistente, ma aprì la strada intorno agli anni '60, allo sviluppo delle conoscenze sui batteri produttori di regolatori microbici della crescita delle piante, oggi denominati rizobatteri.

È sorprendente che dal 1926, quando Kurosawa scoprì l'effetto di *Gibberella fujikuroj* sulle piante di riso a Formosa, poche Compagnie agrochimiche abbiano raccolto questo messaggio, che avrebbe dovuto promuovere, come nella industria farmaceutica per gli antibiotici, la ricerca di nuovi regolatori microbici della crescita delle piante.

Ora sono note oltre 50 gibberelline, tutte con la loro fondamentale struttura chimica (lo gibbano), derivate dall'acido gibberellico, un isoprenoide sintetizzato dall'acido mevalonico.

Le Compagnie hanno commissionato la sintesi chimica dell'ormone, ma non la ricerca di fitoregolatori nei microrganismi che possono produrli.

G. fujikuroji, produce un inibitore della crescita, l'acido fusarico (acido 5-n-butilpicolinico), che potrebbe essere la causa degli effetti controversi della inoculazione di *Fusarium* nelle piante.

Lo sviluppo della ricerca di base sui microrganismi del suolo e della rizosfera ha permesso di riconoscere che i veri candidati a diventare fertilizzanti batterici sono gli azospirilli, che possono fare per le colture cerealicole ciò che *Rhizobium* fa per le leguminose, che l'azotofissazione nelle non-leguminose è più importante quantitativamente di quella delle leguminose, che altri sistemi azotofissatori batterici, come quelli attinorizzici e cianobatterici, prospettano applicazioni di grande interesse nella forestazione e nella risicoltura. Non meno rilevante è la dimostrazione della importanza agraria dell'associazione micorrizica vescicolare arbuscolare.

I mali della moderna agricoltura

Tra i mali della moderna agricoltura vi sono da una parte il crescente input di fertilizzanti, pesticidi, diserbanti etc. e da un'altra la scissione della zootecnia dell'agricoltura ed il flusso a senso unico dalle campagne verso la città dei prodotti agroalimentari con il mancato riciclo di residui e scarti, che

hanno deviato dal terreno le maggiori fonti di carbonio e di azoto. Azoto e fosforo, prima riciclati, sono perduti per lisciviazione ed erosione del suolo con conseguenti danni ecologici ed economici e declino della fertilità.

Le soluzioni microbiologiche a questi mali sono la riduzione dell'input di azotati, la protezione delle piante con metodi microbiologici, il controllo dell'inquinamento e dei patogeni e la conversione dei residui in risorse fertilizzanti.

La ricerca in queste aree è in progresso. Per ridurre l'input di azotati è necessario porre a lavorare l'azotofissazione.

L'area, nella quale la tattica preliminare responsabile dell'adesione batterica che diventa più stretta, è quella radicale, perché l'iniziale contatto fra una radice ed il vicino microrganismo può essere il preludio sia di una fatale infezione, sia di un mutuo beneficio. C'è bisogno d'identificare i gruppi chimici recettori sia per estendere il range di ospiti dei fissatori, sia per sopprimere i patogeni.

Per quanto riguarda il controllo dell'inquinamento attualmente esistono 63.000 prodotti chimici di uso comune ed alcuni di essi sono dannosi per l'uomo, gli animali e le altre forme di vita. I microrganismi sono stati usati per anni nella purificazione delle acque di scarico urbane ed industriali e i rifiuti solidi sottoposti a processi di compostaggio, incenerimento, interrimento etc. Talora queste trasformazioni sono lente ed inefficienti. Perciò è naturale domandarsi se l'ingegneria genetica può essere applicata allo sviluppo di microrganismi per il controllo dell'inquinamento, ma è anche importante domandarsi se i successi in laboratorio possono essere trasferiti in campo.

Un esempio è la degradazione dell'acido 2, 4, 5 -triclorofenossiacetico (2, 4, 5-T) componente di erbicidi, che un ceppo, manipolato con la tecnica dei plasmidi degradativi di *Pseudomonas cepacia*, utilizza come sola fonte di carbonio e di energia, mentre in natura la degradazione richiede il co-metabolismo.

Il ceppo può degradare il 2, 4, 5-T nei terreni contaminati, originariamente presente alla concentrazione di 20.000 µg/g di suolo, mentre è assolutamente inattivo in presenza di piccole quantità di sostanza tossica (2-10 µg di 2, 4, 5-T), che rimangono nel suolo irreversibilmente legati ai colloidi e sono le quantità che praticamente persistono nel terreno.

Le stesse considerazioni valgono per l'impiego di *Citrobacter* nel controllo del cadmio, verso il quale presenta resistenza e capacità di uptake elevate.

Mezzi microbiologici di lotta ai parassiti

Diverso è il caso del controllo dei funghi patogeni (*Sclerotium rolfsii* e *Rizoctonia solani*) con l'impiego di *Trichoderma*, che oltre alla sicurezza eco-

logica, perché a differenza dei fitofarmaci non è tossico, presenta il vantaggio, come per altri inoculanti, di potere essere applicato direttamente ai semi mediante i conidi.

Più di 1000 microrganismi o prodotti microbici si sono dimostrati attivi contro gli insetti, ma solo 14 sono stati approvati dall'Environmental Protection Agency USA (EPA) per l'uso commerciale e comprendono 6 batteri, 4 virus, 3 funghi e 1 protozoo. Sono efficaci contro un tipo di insetto solo durante un particolare stadio di sviluppo. I prodotti microbici non sono specifici e la ricerca è diretta ad allargare il range dei loro ospiti via screening e manipolazione genetica.

Bacillus thuringiensis, *B. popilliae*, *B. lentimorbus* e *B. sphaericus* sono quelli più largamente impiegati.

La lotta biologica con rizobatteri provvisti di pseudobattine e formanti pioluteorina, che attaccano fitopatogeni come *Erwinia carotovora* e *Phytophthora* sp., determina anche promozione della crescita delle piante con aumenti di resa delle colture del 100%.

Infine il riciclo dei residui agricoli. Paglie, stocchi di mais, etc. non vengono restituiti al terreno perché il loro interrimento determina un pericoloso incremento del potenziale infettivo di fitopatogeni e fenomeni fitotossici provocati dalla lenta decomposizione di materiali ad alto rapporto C/N che comporta altresì immobilizzazione dell'azoto assimilabile delle piante. Allora si bruciano, provocando talora lungo le vie di comunicazione incidenti stradali.

Eppure i materiali lignocellulosici rappresentano la maggiore fonte di carbonio necessaria per lo svolgimento dei cicli e la sintesi dell'humus.

Di recente (LYNCH ed al., 1983; 1984) è stato dimostrato che comunità attentamente selezionate di funghi cellulolitici e di *Clostridium butyricum* non solo accelerano la conversione dei residui in compost, ma anche permettono di elevare il contenuto di azoto fino a 5-10 Kg per tonnellata di paglia.

Dal processo messo a punto da Lynch, considerato così interessante da essere coperto da brevetto a cura del British Technology Group (BTG), discendono due possibilità immediate. La prima è che gli agricoltori potrebbero spargere colture miste di cellulolitici ed azotofissatori sulla paglia che si trova nei campi, come parte delle operazioni routinarie, utilizzando raccoglitori convenientemente adattati o mediante separate procedure successive. Secondo i calcoli di Lynch la paglia di un anno produrrebbe un quarto dell'azoto richiesto dalla successiva coltura, con notevole risparmio di azotati.

La seconda alternativa è una procedura più sofisticata: la paglia imballata è inoculata con la coltura mista di funghi e batteri ed incubata in condizioni controllate.

Questi fatti mostrano come si possano superare le limitazioni di azoto

proprie dei materiali cellulosici con risultati agronomicamente e biotecnologicamente interessanti.

In un contributo presentato a questo colloquio viene riportata l'associazione batteri cellulolitici-azospirilli che risulta ancora più interessante dal punto di vista applicativo della degradazione cooperativa tra spp. di *Penicillium* e *Trichoderma* da una parte e *Clostridium butyricum* da un'altra.

Questo tipo di co-coltura si svolge in ambiente apparentemente aerobio, ma la limitata areazione di questi sistemi si consegue con la sommersione e l' N_2 -fissazione è massima alla interfaccia tra ambiente aerobico ed anaerobico.

Gli esempi riportati dimostrano che anche la biotecnologia del suolo, intesa come applicazione integrata di discipline come la microbiologia, l'ecologia, la genetica e l'ingegneria, è destinata a diventare sempre più importante.

Come possano essere applicate tali conoscenze sulle capacità dei microrganismi del suolo è compito della biotecnologia.

Nuovi concetti d'ingegneria e nuove metodologie sono essenziali se si vuole avvantaggiarsi dei progressi in ecologia microbica e microbiologia del suolo.

Le discipline, dalla cui integrazione nasce la biotecnologia, devono intercomunicare più efficacemente. Molto può esser fatto in questo campo, ma sono necessari gli appropriati incentivi per eliminare ritardi ed incertezze.

Lo sviluppo della ricerca di base sull'ingegneria genetica nei microrganismi, della biotecnologia della sintesi di principi biologicamente attivi e della produzione di biomasse inoculanti è capace di assicurare la creazione di nuovi mezzi efficaci di protezione delle piante dai parassiti, di fitoregolatori ed altri preparati per l'agricoltura.

Per far ciò sono necessari inoltre lo sviluppo e la introduzione della biotecnologia per la produzione su larga scala di tali preparati e degli inoculanti.

Lo stato dell'arte delle iniziative biotecnologiche in agricoltura è molto avanzato nel campo degli agrochimici, del miglioramento genetico delle piante agrarie e forestali, specie con lo sfruttamento del « plant tissue culture » (ptc) e la resistenza agli erbicidi.

In biotecnologia del suolo, che si può considerare il parente povero della biotecnologia che è la gallina dalle uova d'oro dato l'afflusso senza precedenti di capitale alle iniziative d'ingegneria genetica, già si delineano iniziative nel campo dell'impiego di *Azospirillum* come biofertilizzante, di *Trichoderma* come antagonista dei fitopatogeni del suolo e nel campo dei micoinsetticidi con investimenti di capitale per la commercializzazione che si aggirano intorno ai $150-200 \times 10^6$ di sterline.

Conclusione

Questi fatti e le considerazioni, brevemente esposti, dimostrano che il quadro delle biotecnologie, che possono essere applicate al terreno per incrementarne la fertilità ed aumentare conseguentemente la produttività agricola e forestale, riguarda la riduzione dei consumi energetici, la conservazione dell'ambiente e la migliore crescita delle piante in terreni più sani.

Il perfezionamento di tali biotecnologie ed il loro sviluppo richiedono una stretta cooperazione interdisciplinare e l'applicazione delle nuove conoscenze derivanti dai progressi compiuti nel campo dell'ecologia microbica e della microbiologia del suolo.

Perciò questo colloquio vuole suscitare l'interesse per alcune innovazioni biotecnologiche promettenti ed essere il primo impulso a realizzare, in un'area così dinamica come quella della scienza del suolo, le applicazioni in campo dei microrganismi e dei processi che più possono concorrere all'incremento della produttività agricola ed adattarsi alle varie condizioni pedologiche e culturali del nostro Paese.

NOTE BIBLIOGRAFICHE

- ELMERICH C. 1984 — *Biotech.*, 2, 957.
LYNCH J.M. 1983 — *Soil biotechnology*. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
FLORENZANO G. 1983 — *Fondamenti di Microbiologia del terreno* - REDA, Roma.
POSTGATE J.R. 1982 — *The fundamentals of nitrogen fixation*. Cambridge University Press, London, 1982.
POWLEDGE T.M. 1984 — *Biotech.* 2, 763.
WIENER J. 1984 — *Biotech.* 2, 861.

L'ANTAGONISMO MICROBICO NEL TERRENO
E SUE POSSIBILI APPLICAZIONI
NEL CONTROLLO DI FITOPATIE

Un triennio di ricerche

G. PICCI, C. FILIPPI e G. BAGNOLI *

Istituto di Microbiologia Agraria dell'Università di Pisa
* Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo, C.N.R., Pisa.

RIASSUNTO

Viene brevemente descritta una serie di ricerche condotte su un ceppo batterico — *Bacillus subtilis* M51 — isolato da terreno nell'ambito di uno studio sistematico sull'antagonismo microbico e relative implicazioni sul controllo di determinate fitopatie.

Tale ceppo batterico, dotato di spiccate proprietà antimicotiche, risulta particolarmente attivo verso *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *dianthi* (Prill. e Del.) Synd. e Hans.

SUMMARY

A strain of *B. subtilis* designed as M51, particularly active *in vitro* and *in vivo* towards *F. oxysporum* Schlecht f. sp. *dianthi* was isolated. Total protection against *Fusarium* up to the 60th day after transplanting was observed; after that date protection decreased rapidly.

L'antagonismo microbico è d'importanza fondamentale per il controllo biologico naturale di molte fitopatie a sede naturale (STRZELCZYK, 1966; DOMMERGUES e MANGENOT, 1970), e, qualora opportunamente mirato, può dar luogo a risultati agronomicamente apprezzabili (TWEIT e WOOD, 1955; WRIGHT, 1956; SHU-YEN e VANGAN, 1965; CHANG e KOMMENDHAL, 1968; MERRIMAN e coll., 1974; MANKAU, 1980; SIGH e MEHROTRA, 1980; LEPIDI e coll., 1980; PAPAVIDAS e LUMSDEN, 1980).

I microrganismi isolati dal terreno e dalla rizosfera di piante coltivate, dotati di proprietà antagoniste, sono riferibili a Schizomiceti (ad esempio *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.); Atti-

nomiceti (ad esempio *Streptomyces griseus*, *Streptomyces* spp.); Eumiceti (ad esempio *Trichoderma* spp., *Penicillium frequentans*, *Penicillium cinerescens*, *Aspergillus restrictus*, *Diplodia* sp., ecc.). Recentemente è stato dimostrato il probabile ruolo di un virus o agente virus-simile sul controllo del cancro americano del castagno (ALFEN e coll., 1975; DAY e coll., 1977; ANAGNOSTAKIS e DAY, 1979; ANAGNOSTAKIS, 1982).

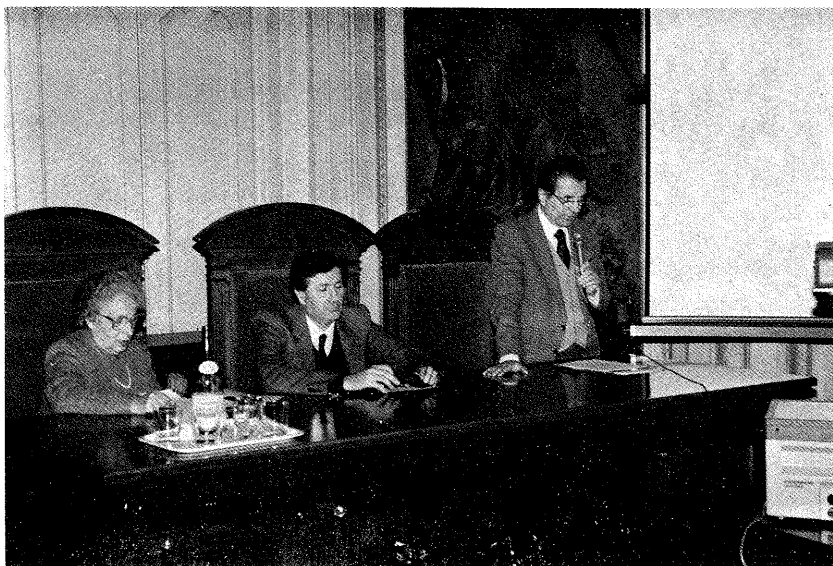
I principali microrganismi fitopatogeni in qualche modo controllabili con metodo biologico, e limitatamente a questi ultimi anni, sono *Fomes annosus*, *Rizoctonia solani*, *Pyronema domesticum*, *Fusarium oxysporum* (DENNIS e WEBSTER, 1971); *Rizoctonia solani* (MERRIMAN e coll., 1974); *Fusarium roseum* (MORISSEY e coll., 1976; COOK e ROVIRA, 1976; DEACON, 1976); *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (OUF e coll., 1981); *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (SNEH, 1981); *Cytospora* sp., *Fusarium* sp., *Graphium ulmi*, *Rizoctonia solani*, *Stereum purpureum* (CHAUMONT e SIMERAY, 1982); *Fusarium moniliforme*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Pithium debaryanum*, *Helminthosporium sorghicola*, *Cocliobolus miyabeanus*, *Verticillium nigrescens*, *Rizoctonia solani*, *Phytophthora citrophthora*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria longipes* (ESPUNI e SIMON-PUJOL, 1982).

Tra questi fitopatogeni, particolarmente importanti sono i Fusari (DEACON, 1976; DENNIS e WEBSTER, 1971; LEPIDI e coll., 1980; MITCHELL e ALEXANDER, 1961; OUF e coll., 1981; SABAOU e coll., 1983; TWEIT e WOOD, 1955) i quali causano danni ingenti alle colture del garofano, nonostante massicce applicazioni di fungicidi che possono arrivare anche ad 1 Kg di prodotto per m² di terreno. Ricerche su *Fusarium roseum* sono state condotte da KOTHS e GUNNER (1967), i quali ottennero effetto protettivo nei riguardi della fusariosi del garofano inoculando nella rizosfera di tale pianta un ceppo chitinolitico di *Arthrobacter* sp.. Risultati analoghi furono ottenuti da ALDRICH e BAKER (1970) con *Bacillus subtilis* e da MICHAEL e NELSON (1972) con *Pseudomonas* sp. e da BAKER e coll. (1979) con diverse specie di funghi.

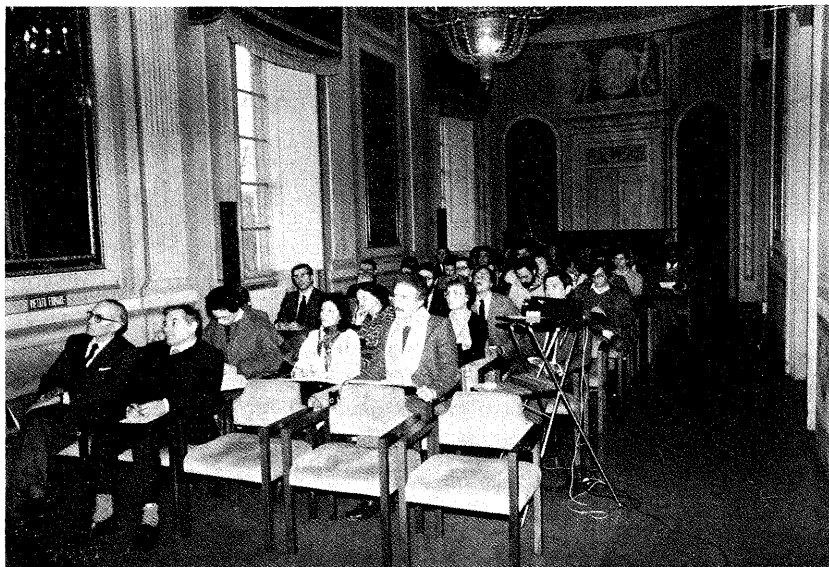
A quanto ci risulta, l'unica ricerca su *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e garofano è stata eseguita da SNEH (1981), il quale isolò dalla rizosfera di tale pianta 15 ceppi di batteri chitinolitici, tutti capaci di lisare il micelio del fusario, con conseguente effetto protettivo per la fitopatìa.

Obiettivo finale delle ricerche da noi intraprese, e che sono tuttora in pieno svolgimento, è quello di isolare uno o più ceppi microbici ad habitat rizosferico, che siano anch'essi capaci di esercitare un controllo biologico sulla fusariosi del garofano e, se possibile, anche di altre piante d'importanza agraria.

In un primo momento vennero isolati da 20 campioni di terreno 32 ceppi batterici dotati di proprietà antagoniste verso diversi funghi fitopatogeni (FILIPPI e coll., 1983).



Il Prof. Picci al tavolo della presidenza mentre presenta la sua relazione.



Un aspetto della Aula magna durante la relazione del Prof. Picci.

Tra questi venne scelto un ceppo siglato M51, e successivamente classificato come *Bacillus subtilis*, a comportamento rizosferico e particolarmente attivo nei riguardi di diversi funghi fitopatogeni, opportunisti e saprofiti, e precisamente: *Alternaria zinniae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus amstelodami*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Drechslera graminea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Fusarium roseum* var. *avenaceum*, *Fusarium roseum* var. *arthrosporioides*, *Penicillium* sp., *Phoma lingam*, *Phomopsis* sp., *Verticillium* sp..

I risultati ottenuti *in vitro* dimostravano chiaramente la produzione da parte dell'M51 di un principio antimicotico, diffusibile in agar (Fig. 1). Tale idiolita risultava evidenziabile fino dalla 12^a h di semina del batterio ed andava aumentando nell'attività, fino a raggiungere un massimo dopo 48 ore. I funghi saggiati come test erano *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Candida albicans* (Fig. 2) (FILIPPI e coll.).

Lo stesso principio antimicotico risultava inoltre fortemente termostabile poichè, dopo l'autoclavatura dell'agar contenente la sostanza, l'azione inibente sull'accrescimento dei funghi saggiati era solo leggermente minore rispetto al controllo (Fig. 3) (FILIPPI e coll., in corso di stampa).

Il pH sembrava non avere azione alcuna sull'azione antimicotica dell'idiolita prodotto, poichè, tamponando il mezzo colturale agarizzato a diversi valori di pH, non si registrava diminuzione alcuna dell'azione inibente (FILIPPI e coll.).

Ancora nell'ambito delle prove *in vitro* è interessante sottolineare il diverso comportamento del liquido colturale batterico a seconda che questo provenga da colture statiche o agitate e sia saggiato in forma liquida o agarizzata. Infatti, il liquido di coltura proveniente da colture agitate non ha alcun effetto inibente adoperato tal quale, mentre invece se proveniente da colture statiche ed adoperato ugualmente tal quale, produce vistosi effetti teratologici nei tubuli germinativi dei conidi dei fitopatogeni saggiati fino dalla 36^a ora ed inibizione completa alla 96^a ora (Fig. 4) (FILIPPI e coll.).

Con liquido colturale agarizzato, l'effetto inibitore è presente sia pure parzialmente anche nel caso di colture agitate, se invece si tratta di colture statiche, l'inibizione è completa sia alla 36^a che alla 96^a ora (FILIPPI e coll.).

Dopo aver messo a punto un'opportuna metodica di batterizzazione delle talee, è stato osservato un effetto protettivo della fusariosi da valutarsi pressochè totale (Fig. 5). Tale effetto si protraeva per circa 60 giorni, dopodichè si registrava un calo precipitoso nella protezione stessa, fino ad arrivare allo stesso grado di mortalità delle piante non batterizzate ed adoperate come controllo.

Pertanto è stata intrapresa un'altra serie di ricerche miranti a studiare:

a) il comportamento del batterio antagonista sulle radici; b) l'esistenza e l'entità di un eventuale livello minimo di presenza batterica sulle radici,

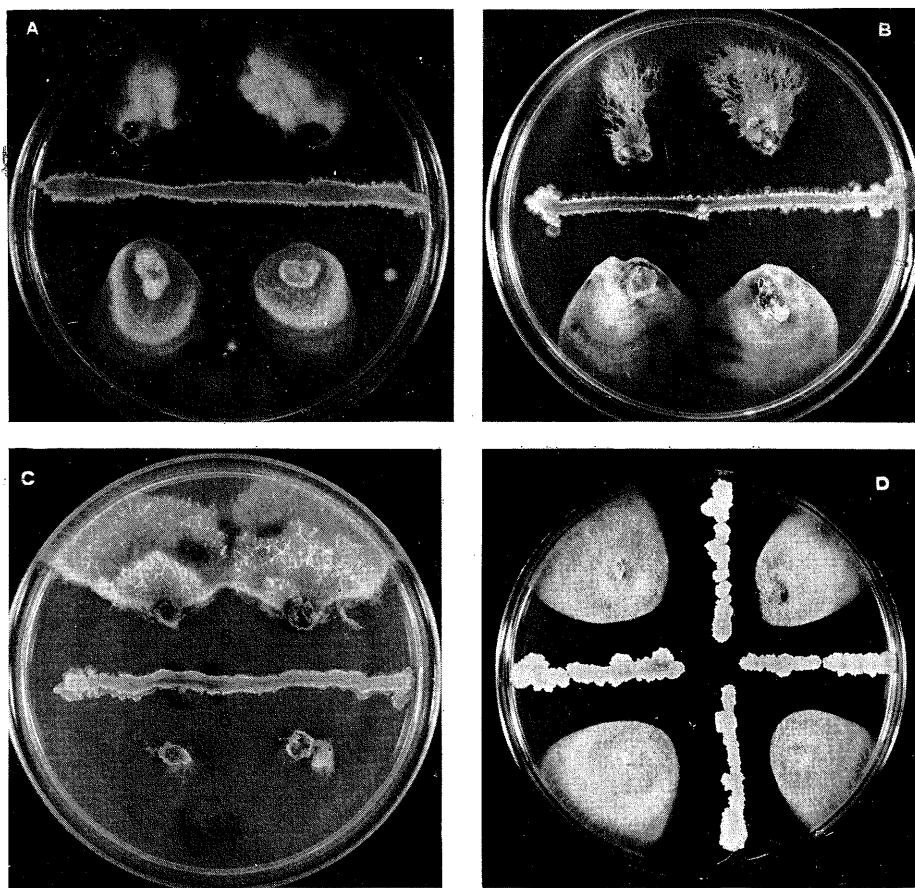


Fig. 1. — Effetti inibitori del ceppo M51 sulla crescita di alcuni micromiceti. A1) *Botrytis cinerea*, A2) *Humicola* sp. B3) *Drechslera graminea*, B4) *Verticillium* sp., C5) *Phomopsis* sp., C6) *Phoma lingam*, D) *Fusarium oxysporum* f.sp.

necessario e sufficiente a garantire una protezione efficace e duratura; c) il momento dell'infezione da *Fusarium* ancora prima che la fitopatologia sia individuabile attraverso la sintomatologia tradizionale (BAGNOLI e coll., 1984).

L'andamento nel tempo del batterio antagonista sulle radici è stato studiato con il ceppo M51 marcato geneticamente, cioè selenomicina-resistente ($5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). In tal modo è stato visto che a partire dal 35° giorno dal trapianto delle talee, si osservava una graduale diminuzione della percentuale di radici sulla quale era presente il batterio, percentuale che scendeva abbastanza

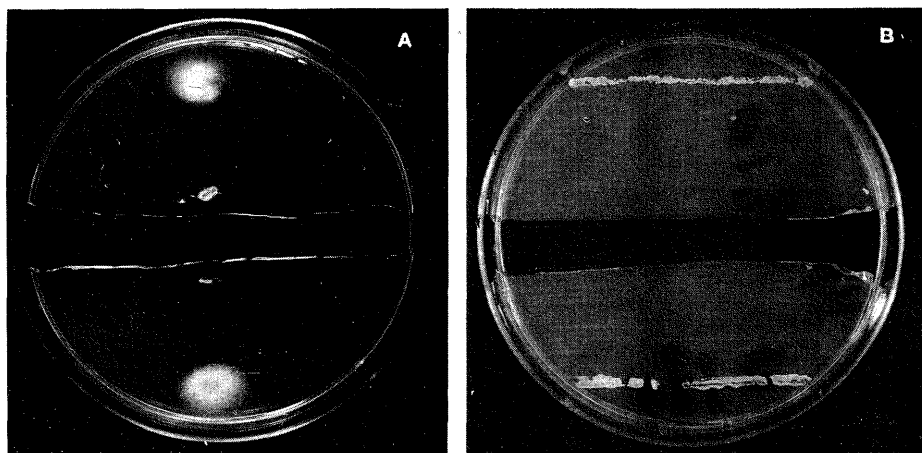


Fig. 2. — Test per la verifica della produzione del principio attivo in funzione del tempo. A) *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* seminato dopo asportazione dello striscio batterico di 12h. B) *Candida albicans* seminato dopo asportazione dello striscio batterico di 48h.

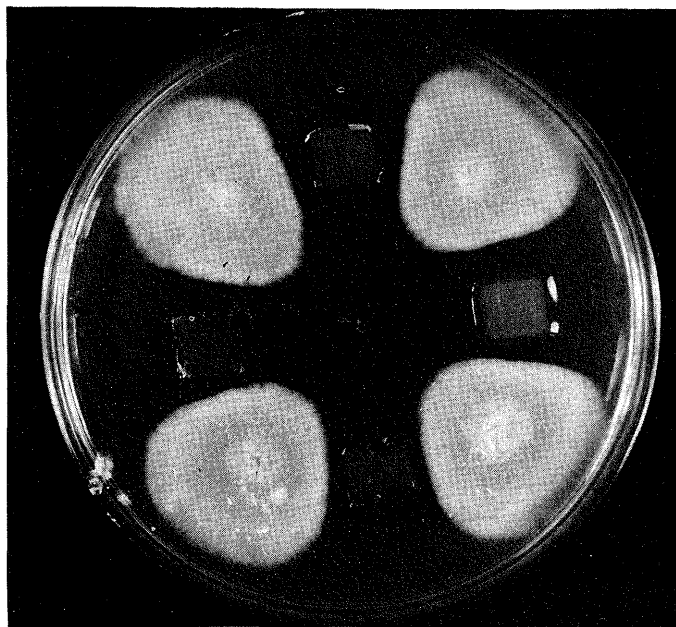


Fig. 3. — Verifica della permanenza del potere antagonista dopo trattamento al calore. (15' a 120°C 1 atm).

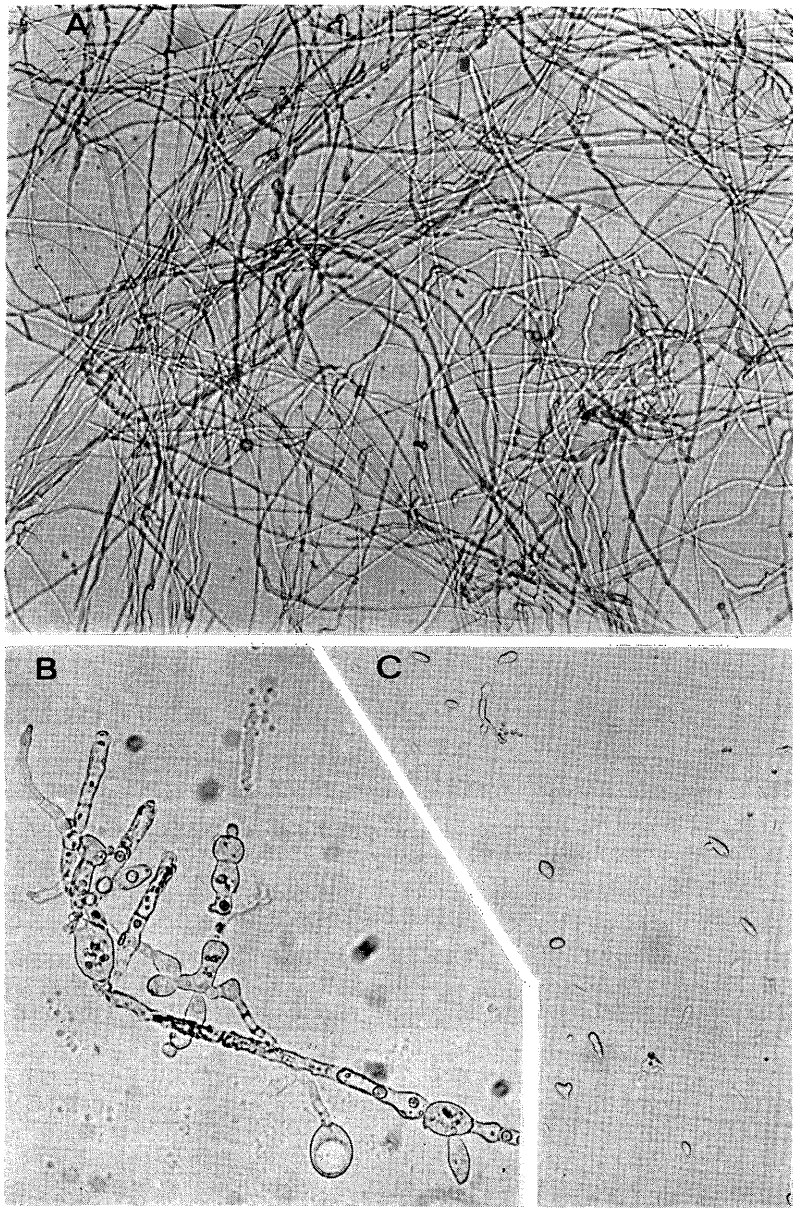


Fig. 4. — Azione sulla germinazione conidica di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. In liquido colturale statico.

A) controllo - B) conidi in liquido colturale di 36h C) conidi in liquido colturale di 96h.



Fig. 5. — 1 - Test di batterizzazione preliminare su talee di garofano, dopo 20 gg. dalla messa a dimora. A) batterizzate, B) controllo.

2 - Prova di batterizzazione su talee di garofano in pieno campo, dopo 60 gg. dalla messa a dimora. A) batterizzato B) controllo.

rapidamente fino ad arrivare a valori molto bassi (10-12%) dopo 80-90 giorni (Fig. 6).

Il rilievo dell'infezione fungina ha dimostrato che questa non avviene fino a che la percentuale delle radici batterizzate è dell'ordine dell'80-90%; al di sotto di tali livelli l'infezione è uguale ai controlli.

Il risultato che si osserva tra la diminuzione della batterizzazione e l'inizio della mortalità è solo apparente in quanto, tra l'attacco del parassita alla radice e la manifestazione della malattia nella parte epigea delle piante, intercorrono mediamente 15-20 giorni (Fig. 7).

I primi stadi dell'infezione delle piante sono stati eseguiti con metodo istologico (PHILLIPS e HAYMAN, 1970) ed in parallelo, per evitare l'inevitabile distruzione delle piante, anche mediante rilievi porometrici e termografici

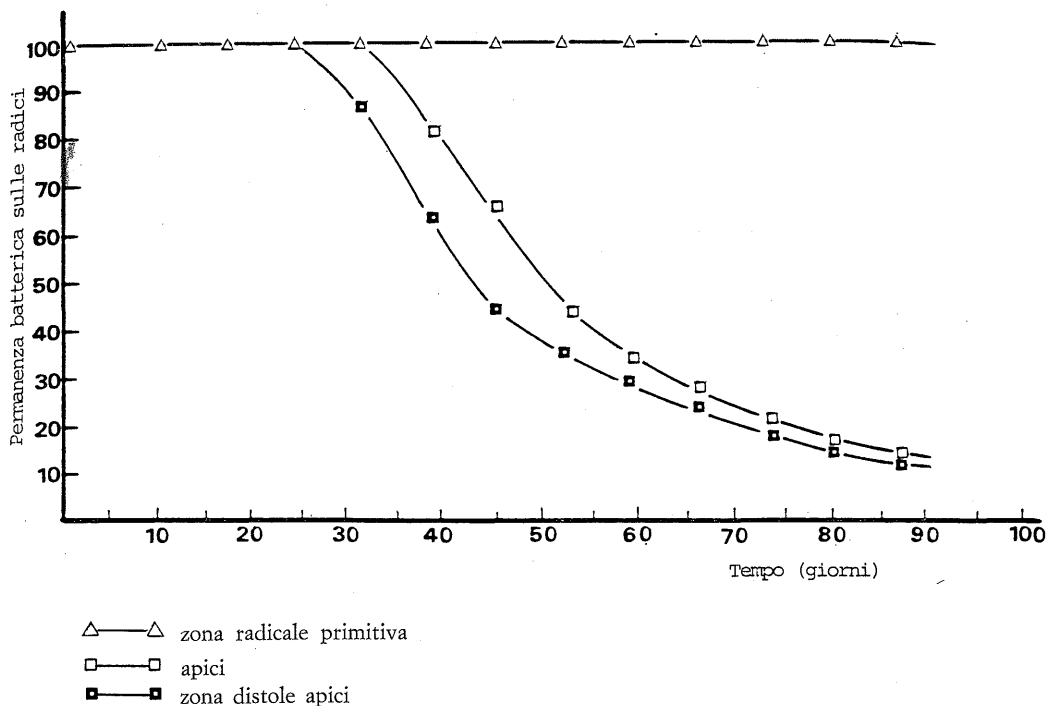


Fig. 6

(BAGNOLI e coll., 1984). Con queste due metodiche l'evidenza dell'attacco del patogeno è indiretta, poichè si evidenzia uno stato di stress da parte delle piante causato appunto dall'attacco del patogeno stesso (Fig. 8-9).

Le ragioni che determinano la diminuzione della batterizzazione e conseguentemente la scomparsa dell'azione protettiva non sono per ora note. Sta di fatto che i rilievi di carattere istologico sulle radici hanno dimostrato che piante con radici batterizzate al di sotto dell'80% presentano addirittura una severità d'attacco del patogeno superiore a quella di piante non batterizzate. Rifacendosi a quanto è noto in letteratura (*inter alia*: LOCHEAD, 1957; KATZNELSON e SIROIS, 1961; RIVIERE, 1963; KATZNELSON e COLE, 1965; FALLOT e coll., 1966; HUSSAIN, 1967; ROTH e coll., 1971; YOUSSEF e MANKARIOS, 1974; MAHMOUD e coll., 1984) la diminuzione della batterizzazione radicale ed il più grave attacco parassitario potrebbero essere messi in rapporto con il comportamento della pianta nei riguardi della popolazione microbica

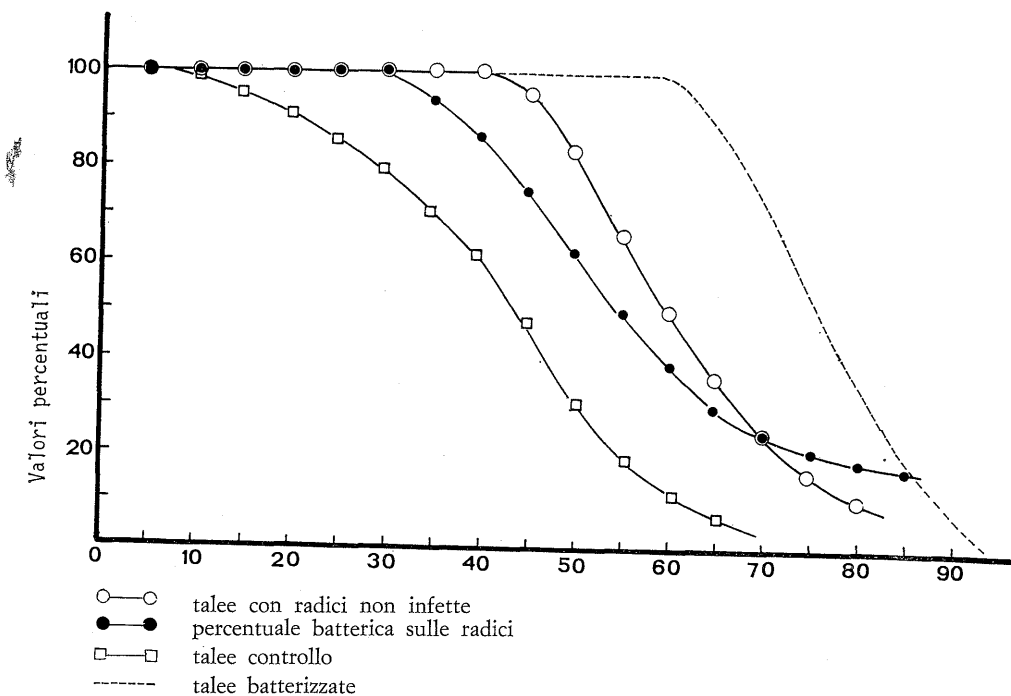


Fig. 7

della rizosfera qualora questa risulti, in modo predominante, costituita da una sola specie di microrganismi.

Ci è sembrato peraltro opportuno intraprendere una nuova serie di ricerche volte a studiare le relazioni tra microflora della rizosfera in piante gnotobiotiche e azione antagonista nei riguardi della fusariosi. La pianta adoperata era *Solanum lycopersicum*, i batteri rizosferici erano rappresentati da 4 ceppi e precisamente: *Bacillus subtilis* M51, *Pseudomonas* sp., *Nocardia* sp., *Streptomyces* sp., anche gli ultimi tre ad azione antagonista verso *Fusarium oxysporum*. Le tesi sperimentali erano realizzate, a parte il terreno sterile quale controllo, batterizzando alternativamente terreno e semi con uno o più ceppi batterici secondo tutte le combinazioni possibili.

I risultati ottenuti hanno dimostrato una chiara azione fitostimolante operata dai ceppi batterici quando questi sono presenti sul seme e non inoculati nel terreno.

Inoltre tale azione stimolante è proporzionale al numero dei ceppi batterici impiegati, nel senso che piante nate da semi batterizzati con il solo



Fig. 8. — Termografia di pianta sana
A1 - parte alta.
A2 - parte bassa.

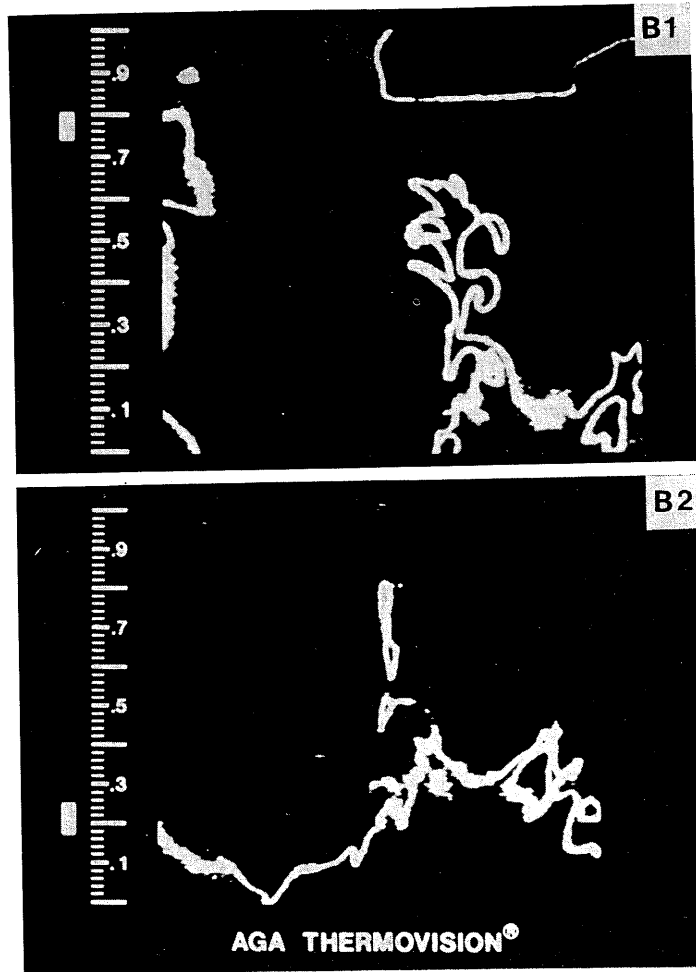


Fig. 9. — Termografia di pianta infetta
B1 - parte alta.
B2 - parte bassa.

M51 perdono il rigoglio vegetativo dopo circa 30 giorni, mentre quelle polixeniche mantengono il rigoglio vegetativo per un tempo molto più lungo.

Questo fatto potrebbe spiegare la temporaneità dell'azione protettiva dell'M51 sulla fusariosi, poichè l'azione antimicotica esercitata dall'idiolita prodotto dall'M51 non sarebbe più sufficiente a garantire la protezione dalla fitopatia. Infatti, il minor rigoglio della pianta porta ad una diminuzione della batterizzazione delle radici e quindi ad una minore presenza del principio antimicotico.

Risultati del tutto preliminari ottenuti da prove in terreno non sterile e massicciamente infettato (circa 3000 propaguli · g⁻¹) con *Fusarium oxysporum* dimostrerebbero che piante di pomodoro co-batterizzate si rivelano più protette dalla fusariosi rispetto a quelle mono-batterizzate. In altri termini, la varietà di sostanze fitostimolanti conferisce alla pianta un maggior rigoglio vegetativo che consentirebbe uno « status » di batterizzazione radicale al di sopra della soglia critica di protezione verso la fusariosi.

BIBLIOGRAFIA

- ALDRICH J. e BAKER R., 1970 — Plant Dis. Rep. 54, 446.
ALFEN VAN N.K., JAYNES R.A., ANAGNOSTAKIS S.L. e DAY P.R., 1975 — Science 189, 890.
ANAGNOSTAKIS S.L., 1982 — Science 215, 446.
BAGNOLI G., FILIPPI C. e PICCI G., 1984 — (in stampa).
BAGNOLI G., BENINCASA F., MARACCHI G. e VENDRAMIN G.G., 1984 — Riv. di Ortofloric. Ital. (in stampa).
BAKER R., HANCHEY P. e DOTTAR S.D., 1979 — Phytopathol. 68, 1495.
CHANG J.P. e KOMMENDAHL T., 1968 — Phytopathol 58, 1395.
CHAUMONT J.P. e SIMERAY J., 1982 — Cryptogamie Mycologie 3, 249.
COOK R.J. e ROVIRA A.D., 1976 — Soil Biol. Biochem 8, 275.
DAY P.R., DODDS J.A., ELLISTON J.E., JAYNES R.A. e ANAGNOSTAKIS S.L., 1977 — Phytopathol. 67, 1393.
DEACON J.W., 1976 — Soil Biol. Biochem. 8, 275.
DENNIS C. e WEBSTER J., 1971 — Trans. Br. Mycol. Soc. 57, 41.
DOMMERMUES Y. e MANGENOT R., 1970 — Ecologie Microbienne du Sol. Masson e Cie Eds.
ESPUNY J.M., SIMON-PUJOL D.M., CONGREGADO F. e SUAREZ FERNANDEZ G., 1982 — Soil Biol Biochem 14, 557.
FALLOT J.J., ROUCH F.S. e CABASSY S., 1976 — Ann. Inst. Pasteur Suppl. T. III, 75.
FILIPPI C., BAGNOLI G. e PICCI G., 1983 — Atti del XX Congr. Naz. Microbiol. Brescia, Gardone Riviera.
FILIPPI C., BAGNOLI G., TREGGI e PICCI G., 1984 — Plant and Soil 80, 119.
HUSSAIN A., 1967 — Czechoslovak Acad. Sci., Ph. D., Praga.
KATZNELSON H. e COLE S.E. 1965 — Can. J. Microbiol. 11, 737.
KATZNELSON H. e SIROIS J.K., 1961 — Nature 203, 851.
KOTHS J.S. e GUNNER H.B., 1967 — Amer. Soc. Hort. Sci. 91, 617.
LEPIDI A.A., FILIPPI C., CASELLA S. e NUTI M.P., 1980 — L'Agr. Ital. 109, 527.
LOCHHEAD A.G., 1957 — Soil Sci. 84, 395.

- MAHMOUD S.A.Z., RAMADAN E.M., THABET F.M. e KHATER T., 1984 — *Zbl. Mikrobiol.* 139, 227.
- MANKAU R., 1980 — *Ann. Rev. Phytopathol.* 18, 415.
- MERRIMAN P.R., PRICE R.D. e BAKER K.F., 1974 — *Aust. J. Agric.* 25, 211.
- MERRIMAN P.R., PRICE R.D., KOLLMORGEN J.F., PIGGOTT T. e RIDGE E.H., 1974 — *Aust. J. Agric. Res.* 25, 219.
- MICHAEL A.H., NELSON P.E., 1972 — *Phytopathol.*, 62, 1052.
- MITCHELL R. e ALEXANDER M., 1961 — *Nature* 190, 109.
- MORRISSEY R.F., DUGAN E.P. e KOTHS J.S., 1976 — *Soil Biol. Biochem.* 8, 23.
- OUF M.F., MAHMOUD S.A.Z., ABDEL-NASSER M. e EL-ADAWY A., 1981 — *Zbl. Bakt.* II Abt. 136, 205.
- PAPAVIZAS G.C. e LUMSDEN R.O., 1980 — *Ann. Rev. Phytopathol.* 18, 389.
- PHILLIPS J.M. e HAYMAN D.S., 1970 — *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55, 158.
- ROTH C.V., HOCH J.A. e MOSS R.D., 1971 — *J. Bact.* 106, 97.
- SABAOU N., BOUNAGA N. e BOUNAGA D., 1983 — *Can. J. Microbiol.* 29, 194.
- SHU-YEN L. e VANGAN E.K., 1965 — *Phytopathol.* 55, 986.
- SINGH P.J. e MEHROTRA R.S., 1980 — *Plant and Soil* 56, 475.
- SNEH B., 1981 — *Phytopathol. Z.* 100, 251.
- STRZELCZYK E., 1966 — *Suppl. Ann. Inst. Pasteur* 111, 314.
- TWEIT M. e WOOD R.K.S., 1955 — *Ann. Appl. Biol.* 43, 538.
- WRIGHT J.M., 1956 — *Plant and Soil* 8, 132.
- YOUSSEF Y.A. e MANKARIOS A.T., 1974 — *Biologia Plantarum, Praga* 17, 175.

LA DIGESTIONE ANAEROBICA DELLE DEIEZIONI ANIMALI COME PROCESSO PER LA PRODUZIONE DI BIOGAS E DI FERTILIZZANTI (*)

C. SORLINI, G. RANALLI, A. FERRARI, V. TRECCANI

Istituto di Microbiologia agraria e tecnica - Università, Milano.

RIASSUNTO

Sono stati considerati sotto il profilo microbiologico due aspetti strettamente correlati finalizzati ad un recupero energetico da deiezioni animali: a) digestione anaerobica con produzione di biogas in relazione alle variazioni quali-quantitative dei gruppi microbici responsabili della metanogenesi presenti in deiezioni bovine e suine; gli animali venivano mantenuti in condizioni diverse in particolare per quanto riguarda la dieta e le tecniche di allevamento; b) problemi inerenti l'utilizzazione come fertilizzanti delle deiezioni dopo digestione anaerobica.

SUMMARY

Two strictly linked aspects have been considered on the microbiological side concerning the utilization of the animal feces toward an energetic recovery: a) anaerobic digestion with production of methane related with qualitative and quantitative variations of microbial groups involved in methanogenesis present in cattle and swine feces; animals concerned have been treated in different conditions, particularly as diets and breeding techniques; b) problems regarding utilization as fertilizers of feces after anaerobic digestion.

Negli ultimi anni, in seguito alla crisi energetica, hanno assunto maggior interesse le ricerche rivolte alle fonti di energie alternative fra cui la digestione anaerobica di materiali di scarto che consente la produzione di metano e la loro utilizzazione come fertilizzanti dopo digestione.

Al fine di portare un contributo alle conoscenze su questo argomento, sono state svolte indagini:

— sulle variazioni quantitative dei gruppi microbici responsabili della metanogenesi, presenti nelle deiezioni bovine e suine di animali allevati in condizioni diverse, e negli effluenti degli impianti di produzione di biogas dopo digestione anaerobica delle deiezioni stesse;

— sui problemi inerenti l'utilizzazione degli effluenti dei digestori anaerobici come fertilizzanti.

(*) Ricerca finanziata dalla Regione Lombardia.

Tali indagini rientrano in un programma più ampio di ricerche sulla produzione biologica di metano da reflui zootecnici condotte in modo coordinato dalla Regione Lombardia con gli Istituti di Microbiologia Agraria, Chimica Agraria e Ingegneria Agraria dell'Università degli Studi di Milano.

Le prove sono state eseguite su campioni di deiezioni suine e bovine prelevate da quattro diversi allevamenti le cui caratteristiche sono riportate nella tabella 1.

Per quanto riguarda le ricerche microbiologiche si è operato secondo metodiche precedentemente descritte (1-4).

Tab. 1. — Stalle e impianti di digestione considerati.

Località	Bestiame allevato	Tipologia della stalla	Tempo di esposizione all'aria delle deiezioni	Tipologia del digestore	Note
Landriano	Bovini	Stabulazione libera con paddok a pulizia settimanale	7 gg	Monostadio, plug-flow (riscaldato a pannelli solari)	
Manerbio	Suini	A grigliato (reparto ingrasso)	12 h	Monostadio, agitaz. pneumatica - 35°C	
Mediglia	Suini	A pavimento pieno con corsia di defecazione esterna-pulizia a secco, con asportazione	12-16 h	Monostadio, agitaz. pneumatica - 35°C	
Barbiselle	Bovini	Stabulazione libera con cuccette e asportazione meccanica	24 h	Monostadio, agitaz. idraulica meccanica 35°C	Digestione alimentare anche con deiezioni suine provenienti da altra azienda.

RISULTATI

Influenza della dieta sulla composizione della microflora responsabile della metanogenesi in deiezioni bovine

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche condotte su campioni di deiezioni fresche di bovini diversamente alimentati consentono di affermare che la dieta influenza la composizione della microflora delle deiezioni: con dieta secca si ha un maggior numero di microrganismi anaerobi eterotrofi generici e cellulolitici, mentre la dieta fresca favorisce la crescita dei metanigeni (5).

Influenza delle tecniche di allevamento sulla sopravvivenza dei batteri metanigeni nelle deiezioni

A seguito di un'indagine preliminare che ha consentito di rilevare che le cariche dei batteri metanigeni sono significativamente più elevate nelle deiezioni suine mentre quelle degli schizomiceti anaerobi eterotrofi generici sono più elevate nelle deiezioni bovine, sono state eseguite analisi microbiologiche al fine di evidenziare il numero dei batteri metanigeni presenti nelle deiezioni fresche e nelle deiezioni stoccate, dopo esposizione all'aria per tempi più o meno prolungati a seconda della tipologia della stalla.

I risultati ottenuti, dimostrano che nel caso in cui le deiezioni rimangono esposte all'aria per tempi prolungati (7 gg), si evidenzia un abbattimento dei batteri metanigeni di circa 10 volte, mentre nelle deiezioni esposte all'aria per intervalli di tempo inferiori alle 16 ore il loro numero rimane costante.

Rapporto tra cariche dei microrganismi responsabili della metanogenesi e quantità di metano prodotta

È stata messa a confronto la quantità di biogas prodotto, espressa in litri/kg di solidi volatili, con le cariche dei gruppi trofici responsabili della metanogenesi (idrolitici, acetogeni e metanigeni) presenti nei materiali in ingresso e in uscita dei quattro impianti di digestione considerati. I risultati ottenuti hanno consentito di rilevare che:

- le cariche dei batteri idrolitici nei materiali in entrata e durante la digestione rimangono praticamente costanti su valori dell'ordine di 10^8 ;
- le cariche degli acetogeni nei materiali in entrata variano da circa 10^8 a 10^{10} . Durante la digestione prevale una tendenza alla diminuzione a volte anche rilevante;
- le cariche dei batteri metanigeni in entrata variano a seconda del tipo di deiezione fra 10^7 e 10^8 . Durante la digestione si sono ottenuti deboli incrementi di questi microrganismi;
- non si è riscontrata una correlazione tra produzione di metano e numero di batteri idrolitici e acetogeni;
- le rese più elevate di biogas si sono ottenute negli impianti o nei periodi in cui si sono evidenziate le cariche più alte di batteri metanigeni.

Quanto sopra dimostra che per ottenere un'alta produzione di metano è importante che nei materiali di alimentazione sia presente una elevata carica di metanigeni. Pertanto, la dieta, che influenza la composizione della microflora nelle deiezioni e le tecniche di allevamento che consentono una maggior sopravvivenza dei metanigeni nelle deiezioni, svolgono un ruolo essenziale nel-

l'ottimizzazione del processo di metanogenesi. In particolare diete fresche e tipologie di stalle che comportano brevi esposizioni all'aria delle deiezioni costituiscono condizioni più idonee alla produzione di metano.

Aspetti biologici ed igienico-sanitari dell'utilizzazione dei reflui a scopo fertilizzante

Le ricerche fino ad ora condotte hanno riguardato l'influenza, esercitata sul terreno, della somministrazione di liquami bovini, letame, residui colturali interrati, fanghi di depurazione e concimazione chimica associata e non a liquami suini (6-9).

I risultati ottenuti presso gli Istituti di Microbiologia agraria e di Chimica agraria hanno consentito di rilevare che:

— alcune attività enzimatiche del suolo, come quella ureasica e quella fosfataseica, acida e alcalina possono non subire alcuna variazione o variazioni di entità diverse a seconda delle proprietà chimiche del fertilizzante utilizzato e delle caratteristiche pedoclimatiche del suolo trattato;

— il potere nitrificante del suolo, aumenta ed interessa anche gli strati meno superficiali;

— nessuna variazione significativa si rileva nel numero di diversi gruppi microbici (batteri eterofiti, azotofissatori, ammonificanti, cellulolitici); l'unica eccezione è rappresentata dall'incremento, costantemente rilevato, dei batteri nitrosanti e nitricanti, in accordo con il riscontrato aumento della concentrazione dei nitrati nel terreno dopo ogni genere di trattamento.

Per quanto riguarda gli aspetti igienico-sanitari relativi all'utilizzo come fertilizzanti degli effluenti dei digestori anaerobici alimentati con deiezioni animali, è da rilevare che, a differenza di quanto noto sulla resistenza dei microrganismi patogeni negli escrementi concentrati quali il letame, dove tali forme microbiche scompaiono nel giro di qualche settimana (al massimo entro il completamento della maturazione), poco si sa sul loro destino nel liquame diluito e nei liquami digeriti. I risultati ottenuti da un'indagine preliminare possono essere così riassunti:

— la digestione anaerobica di deiezioni bovine in condizioni normali (20 gg a 35°C) comporta un aumento dei clostridi solfito-riduttori ed una riduzione dei coliformi e streptococchi fecali ma non il loro totale abbattimento;

— con la digestione a temperature più elevate (65°C) si ottiene l'abbattimento totale dei coliformi fecali;

— dopo digestione a 35°C per 20 giorni e successivo lagunaggio anaerobico a temperatura ambiente per 20 giorni degli effluenti, si verifica l'abbattimento totale dei coliformi fecali, una drastica riduzione degli streptococchi

fecali, mentre il numero delle spore dei clostridi solfito-riduttori si mantiene costante.

I risultati preliminari ottenuti, anche se insufficienti per trarre delle conclusioni definitive, consentono di affermare che nessuno dei trattamenti considerati porta al totale abbattimento delle cariche dei batteri fecali presenti nelle deiezioni bovine. Solo la digestione anaerobica a 65°C dà risultati lievemente migliori che non quella a 35°C per 20 giorni, e comunque meno soddisfacenti rispetto a quelli ottenuti dopo digestione a 35°C per 20 giorni, seguita da lagunaggio anaerobico per 20 giorni a temperatura ambiente.

È da rilevare infine che in Italia non esiste una legge che regoli l'utilizzo dei fanghi zootecnici come fertilizzanti; come riferimento può essere considerata la normativa emanata dal Consiglio Federale Svizzero per la Protezione dell'Ambiente che limita l'utilizzazione agricola ai soli fanghi civili « igienizzati » cioè con carica inferiore a 100 enterobatteri per grammo di peso secco. Questi valori potrebbero essere ritenuti indicativi anche per i liquami zootecnici il cui uso agricolo necessita certamente di una regolamentazione ufficiale anche dal punto di vista igienico-sanitario.

BIBLIOGRAFIA

- (1) SORLINI C., FERRARI A., TRECCANI V. (1982) — *Valutazioni microbiologica della qualità dei fanghi dei digestori anaerobici ai fini della produzione di metano*. Atti 43° T.U.E.M.A. - Camerino, p. 59.
- (2) POCHON J. and TARDIEUX P. (1962) — *Techniques d'analyses en microbiologie du sol*. St. Mandé. Ed. La Tourelle.
- (3) TIECCO G.F. (1975) — *Microbiologia degli alimenti di origine animale*. Ed. Agricole
- (4) I.R.S.A. - C.N.R. (1973) — *Metodi analitici per le acque*. 3.
- (5) SORLINI C., FERRARI A., RANALI G. (1983) — *Effetti della dieta e dell'esposizione all'aria sul numero di schizomiceti anaerobi totali, cellulosolitici e metanigeni presenti nelle deiezioni bovine*. Riv. Zoot. Vet., 11, 316.
- (6) VANDONI M.V., FERRARI A., FARINI A., ALLIEVI L., PACINI N. — *Effetti della somministrazione di liquami bovini sulle caratteristiche chimiche e microbiologiche del suolo*. Rivista di Agronomia, 13, 287.
- (7) GOLDBERG FEDERICO L., FERRARI A. (1982) — *Influenza della somministrazione di liquami zootecnici sulle proprietà biologiche del terreno*. Atti Convegno « Inquinamento del terreno. Somministrazione al terreno degli effluenti di allevamenti intensivi zootecnici », Udine, p. 81.
- (8) GOLDBERG FEDERICO L., FARINI A., VANDONI M.V., ALLIEVI L. (1982) — *Effetti della somministrazione dei liquami zootecnici sulla proprietà chimiche e biologiche del suolo*. Agricoltura e Ambiente, 4, 41 (1982).
- (9) FARINI A., VANDONI M.V., ALLIEVI L., FERRARI A., PACINI N. (1982) — *Effetti della somministrazione di materiali organici sulle caratteristiche chimiche e biologiche del suolo*. Nota II. Rivista di Agronomia, 16, 384.

12

12

SULLA DETERMINAZIONE IN VITRO E IN VIVO DELLA EFFICIENZA AZOTO-FISSATRICE DEI CIANOBATTERI ETROCISTATI

M. VINCENZINI, F. BOCCI, R. MATERASSI

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica - Università
e Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - C.N.R. Firenze

RIASSUNTO

La efficienza con cui i microrganismi azotofissatori eterotrofi riducono l'azoto molecolare è definita dalla quantità di azoto ridotto per unità di carbonio e può essere valutata indirettamente dal rapporto C_2H_2 ridotto- H_2 svolto all'aria) / C_2H_2 ridotto.

Nel caso dei cianobatteri eterocistati il processo di azotofissazione è più complesso coinvolgendo molteplici attività metaboliche. In questi organismi la valutazione della efficienza relativa di azotofissazione non consente di ottenere risultati indicativi quanto quelli ricavati applicando la relazione ai microrganismi eterotrofi poiché non è stata riscontrata evoluzione di H_2 in aria.

Per i cianobatteri eterocistati, essendo la radiazione luminosa la fonte energetica primaria necessaria al funzionamento della nitrogenasi, una corretta definizione di efficienza di azotofissazione deve correlare la quantità di azoto fissato al numero di fotoni assorbiti.

Per una quantificazione pratica del processo di azotofissazione mediato da cianobatteri viene suggerita l'adozione di procedure differenziate per poter soddisfare diverse esigenze di informazione.

I risultati derivanti dall'impiego di tali procedure consentono di selezionare in laboratorio e all'aperto in condizioni di coltura massiva le specie a più elevata capacità azotofissatrice, di saggiare la attività della nitrogenasi cianobatterica in campioni di terreno inoculati e di avere una indicazione sulla efficienza azotofissatrice.

Più complessa risulta infine la valutazione dell'efficienza di azotofissazione dei sistemi simbiotici cianobatterici per i quali sono state riscontrate anomalie che devono ancora essere chiarite.

SUMMARY

Different procedures for a right definition of the cyanobacterial nitrogen fixation are reported. The resulting data allow to select in laboratory and outdoor, in mass culture experiments, the species with the highest nitrogen fixing capacity, to assay the nitrogenase activity in soils inoculated with cyanobacteria and to obtain some information about the efficiency of the process.

Introduzione

Le conoscenze sul processo di fissazione dell'azoto molecolare mediato dai cianobatteri eterocistati sono in questi ultimi anni notevolmente progredite grazie soprattutto al chiarimento delle relazioni esistenti nelle eterocisti tra metabolismo dell'azoto e dell'idrogeno, fotosintesi e trasformazione dei composti organici provenienti dalle cellule vegetative (1). Questi chiarimenti costituiscono il necessario presupposto teorico per la definizione e la successiva determinazione sperimentale della efficienza di azotofissazione ed è quindi opportuno ricordarne i punti salienti (figura 1).

In condizioni di azotofissazione la eterocisti dipende dalla cellula vegetativa solo per l'approvvigionamento di fotosintetato (mono o disaccaridi) ed a sua volta rifornisce le cellule vegetative di azoto combinato (glutammina o glutammato).

L' α -chetoglutarato, indispensabile per la sintesi di glutammato via GOGAT, viene prodotto all'interno delle eterocisti per trasformazione dei carboidrati attraverso la via dei pentoso fosfati e un ciclo incompleto degli acidi tricarbossilici (ossalacetato viene generato per azione della fosfoenolpiruvato carbossilasi). Le attività cataboliche a carico dei carboidrati provenienti dalle cellule vegetative sono inoltre la fonte dei piridin nucleotidi ridotti da cui prevalentemente dipende la riduzione, termodinamicamente sfavorita in condizioni standard, della ferredossina, donatore elettronico della nitrogenasi. La generazione di ferredossina ridotta appare comunque critica dal momento che gli enzimi glucosio-6-fosfato deidrogenasi, 6-fosfogluconato deidrogenasi ed isocitrato deidrogenasi, dai quali dipende la formazione di NADPH nella via dei pentoso fosfati e nel ciclo incompleto dell'acido citrico, sono influenzati negativamente dai valori del rapporto NADPH/NADP⁺ risultati ottimali per l'attività della NADPH-Fd ossido-riduttasi.

Malgrado la possibile limitazione nell'approvvigionamento di potere riducente, la nitrogenasi catalizza contemporaneamente la riduzione dell'azoto molecolare e la formazione di idrogeno gassoso in rapporto molare prossimo a 1:1 anche a pressioni parziali di N₂ pari a 50 atmosfere e quindi dissipa, in una reazione apparentemente parassita, il 25% dell'ATP e del NADPH utilizzati (ATP viene attivamente rifornito attraverso la fotofosforilazione ciclica).

L'idrogeno prodotto non è comunque destinato ad essere inevitabilmente liberato nell'atmosfera: un recupero, mediato da idrogenasi unidirezionale, può realizzarsi all'interno della stessa eterocisti e generare, attraverso due distinti processi metabolici, ATP e potere riducente.

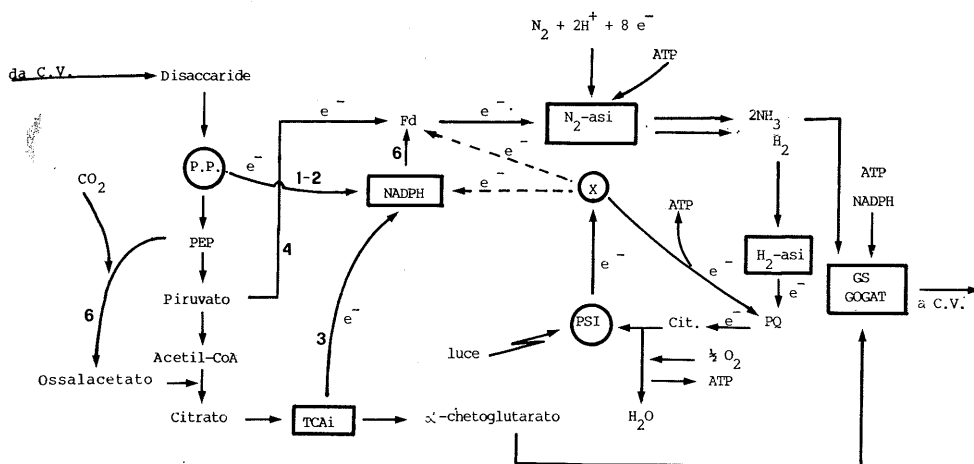


Fig. 1. — Schema del processo di azotofissazione nelle eterocisti.

LEGENDA:

- 1 - Glucosio 6 P deidrogenasi
- 2 - 6 P gluconato deidrogenasi
- 3 - Isocitrato deidrogenasi
- 4 - Piruvato-Fd-ossido riduttasi
- 5 - Fosfoenolpiruvato carbossilasi
- 6 - NADPH-Fd ossidoriduttasi
- N₂-asi - Nitrogenasi
- H₂-asi - Idrogenasi unidirezionale
- GS - Glutammia sintetasi
- GOGAT - Glutammato sintasi
- P.P. - Via dei pentoso fosfati
- PEP - Fosfoenolpiruvato
- TCA_i - Ciclo incompleto degli acidi tricarbossilici
- Fd - Ferredossina
- PS I - Fotosistema I
- X - Accettore elettronico del fotosistema I
- PQ - plastoquinone 9
- cit - citocromo c
- C.V. - cellula vegetativa

Idrogeno ed idrogenasi sono in grado di sostenere l'attività della nitrogenasi con una reazione fotodipendente, mediata dal fotosistema I, e di generare ATP con una reazione dipendente da O₂, ma non dalla luce (reazione Knallgas). Pur fornendo ATP addizionale la funzione principale riconosciuta a quest'ultima reazione è però quella di proteggere l'enzima nitrogenasi dall'O₂ che giunge nelle eterocisti attraverso i plasmodesmi.

Efficienza di azotofissazione

La breve descrizione delle reazioni che nei cianobatteri eterocistati sono direttamente ed indirettamente coinvolte nella riduzione dell'azoto molecolare dovrebbe averne sufficientemente illustrato il grado di complessità.

Per il compimento della reazione azotofissatrice, ed in particolare per i modi in cui soddisfa le esigenze di ATP e NADPH, la eterocisti si comporta da cellula eterotrofa rispetto al rifornimento di NADPH e da cellula fotosintetica per l'approvvigionamento di ATP. Negli azotofissatori eterotrofi non fotosintetici il fabbisogno di ATP e NADPH per la riduzione dell'azoto molecolare è soddisfatto da composti organici esogeni l'efficienza azotofissatrice è definita, in modo semplice e valido, dalla quantità di azoto ridotto per unità di carbonio organico consumato.

Gli organismi che possiedono una idrogenasi unidirezionale, recuperando l'idrogeno prodotto dalla nitrogenasi, sono in grado di utilizzare più efficientemente il substrato organico: ad un miglioramento del bilancio energetico corrisponde una maggiore efficienza azotofissatrice. In accordo con questo principio, per le simbiosi delle leguminose è stata proposta una procedura di valutazione della efficienza di azotofissazione che tiene conto della energia recuperata via idrogenasi (2):

$$\text{Efficienza relativa (RE)} = 1 - \frac{\text{H}_2 \text{ svolto in aria}}{\text{C}_2\text{H}_2 \text{ ridotto}}$$

Il metodo, basato principalmente sull'assunto che la utilizzazione via idrogenasi dell'idrogeno svolto dalla nitrogenasi avvenga con equivalenza energetica, non è rigoroso, tuttavia ha consentito di differenziare le attività azotofissatrice di diverse specie di rizobi e quindi di selezionare i ceppi più efficienti.

La stessa relazione applicata ai cianobatteri eterocistati non produce risultati altrettanto indicativi per il fatto che con la quasi totalità delle specie saggiate non è stato possibile rilevare produzione di idrogeno.

Non sembra d'altra parte plausibile (anche se non da escludere) che tutti gli organismi saggiati abbiano una uguale e massima efficienza relativa di azotofissazione. La assenza di evoluzione di H₂ è al più indice di una elevata attività idrogenasica.

Nei cianobatteri eterocistati la fonte primaria dell'ATP e degli equivalenti riducenti necessari alla nitrogenasi è, in ultima analisi, la luce. Una corretta definizione di efficienza di azotofissazione non è altro che la efficienza fotosintetica di conversione della luce in azoto ridotto a partire da azoto molecolare. Una determinazione di efficienza così definita non è stata però, per quanto ci risulta, ancora eseguita, eppure costituirebbe una preziosa fonte

di informazioni per una maggiore conoscenza dei processi bioenergetici operanti negli organismi fotosintetici. Generalmente per la quantificazione del processo di azotofissazione vengono preferiti metodi basati o sulla determinazione dell'azoto organicato (Kjeldahl, N^{13} , N^{15}) o sul saggio di riduzione dell'acetilene.

Dal momento che spesso è stato fatto un uso improprio del termine efficienza azotofissatrice, per i cianobatteri eterocistati noi vorremmo suggerire l'adozione di parametri di valutazione differenziati, in grado cioè di soddisfare diverse esigenze di informazione, e rispondenti alla seguente terminologia:

- 1) capacità azotofissatrice;
- 2) attività azotofissatrice;
- 3) indice di efficienza azotofissatrice.

Capacità azotofissatrice

Per capacità azotofissatrice si intende la quantità di azoto realmente organicata dall'unità di biomassa nell'unità di tempo e potrebbe pertanto essere meglio definita come tasso di organicazione dell'azoto molecolare.

La determinazione può essere ottenuta dal prodotto del tasso specifico di crescita del cianobatterio per il suo contenuto in azoto (supposto costante durante la valutazione del tasso di crescita). I due parametri sono facilmente valutabili e, a nostro parere, permettono di giustificare in modo concreto il processo di azotofissazione dei cianobatteri.

La conoscenza della capacità azotofissatrice condotta prima nelle condizioni controllate di laboratorio e quindi all'aperto in condizioni naturali di temperatura ed illuminazione, consente di ottenere indicazioni precise sulla specie cianobatterica più efficiente per la preparazione, ad esempio, di inoculanti azotofissatori.

Il parametro è stato sperimentalmente verificato con la simbiosi azotofissatrice tra la felce acquatica *Azolla* ed il cianobatterio *Anabaena azollae* fornendo informazioni determinati per la scelta della specie più adatta alle condizioni climatiche dell'Italia centrale (3).

Attività azotofissatrice

Il saggio di riduzione dell'acetilene è ormai da tempo risultato anche per i cianobatteri un ottimo e praticamente insostituibile metodo di valutazione dell'attività dell'enzima nitrogenasi.

Dal momento che l'acetilene inibisce la attività della idrogenasi unidirezionale, il tasso di riduzione dell'acetilene, espresso come $\text{nm C}_2\text{H}_4$ formato $(\text{mg di peso secco di biomassa})^{-1} \text{ min}^{-1}$, può essere ritenuto rappresentativo del flusso totale di elettroni che passano per l'enzima nitrogenasi anche se mancano a tutt'oggi evidenze sperimentali in vivo sulla indipendenza del flusso elettronico dal substrato.

La procedura risulta estremamente versatile tanto da poter essere facilmente impiegata anche nella valutazione in campo della attività azotofissatrice di suoli inoculati con cianobatteri eterocistati. In questo caso, per quantificare la sola azotofissazione cianobatterica, è necessario escludere dal valore di riduzione di acetilene il contributo di eventuali azotofissatori non fotosintetici e la quota relativa alla produzione endogena di etilene (C_2H_2 inattiva la etilene ossidasi).

A tal fine è sufficiente valutare la riduzione dell'acetilene in condizioni di buio e sottrarre questo valore a quello ottenuto alla luce. In campo la determinazione può essere realizzata impiegando, in saggi paralleli, cilindri trasparenti ed anneriti senza fondo e con una estremità dotata di membrana al silicene. I cilindri (15-20 cm di lunghezza) vanno inseriti nel terreno in modo che sporgono da questo per circa 5 cm. Con una dose di inoculanti cianobatterici pari a 2 Kg ha^{-1} , cilindri del diametro di 10 cm e tempi di incubazione (10% C_2H_2 in aria) di 30-60 minuti rispondono bene alle necessità del saggio.

Indice di efficienza azotofissatrice

Con questo parametro intendiamo indicare l'efficienza di trasferimento all'azoto degli elettroni che passano per la nitrogenasi e, ricordando che il tasso di riduzione dell'acetilene può essere considerato rappresentativo del flusso totale di elettroni che attraversano la nitrogenasi, può essere calcolato dal rapporto tra la attività e la capacità azotofissatrice.

Se la nitrogenasi non catalizzasse, contemporaneamente alla riduzione di azoto, la formazione di idrogeno, il valore di tale rapporto dovrebbe essere uguale a 3, mentre varrebbe 4 nel caso di una formazione di H_2 equimolecolare con l' N_2 ridotto. Tenendo presente la possibile attività della idrogenasi unidirezionale, il valore del rapporto (C_2H_2 ridotto/ N_2 fissato) dovrebbe essere compreso tra 3 e 4.

Elevate efficienze di trasferimento elettronico all'azoto dovrebbero pertanto trovare riscontro in valori del rapporto $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2$ prossimi a 3.

Una deviazione da questo comportamento teorico è stata osservata con la simbiosi *Azolla - Anabaena azollae* che manifesta valori compresi tra 1.5 e 2 (4). Il fenomeno è stato interpretato, sulla scorta dei risultati ottenuti da

altri ricercatori con la simbiosi delle leguminose (5), postulando un effetto negativo dell'acetilene sulla attività mixotrofica del cianobatterio o sul processo di traslocazione del fotosintetato dalle felce al simbionte. In attesa di chiarimenti che risolvano le perplessità recentemente sollevate sulla validità del saggio di riduzione dell'acetilene nel caso di sistemi azotofissatori complessi, è bene trarre dal valore di questo parametro una informazione puramente indicativa.

Considerazioni conclusive

La determinazione della reale efficienza azotofissatrice dei cianobatteri eterocistati (N_2 fissato per fotone assorbito) è in definitiva una procedura rigorosa impiegabile esattamente solo nello studio di specie axeniche di cianobatteri in crescita su mezzi liquidi e quindi valutabile solo in laboratorio.

Nella pratica il processo di azotofissazione può venire quantificato attraverso la determinazione di altri parametri la cui adozione dipenderà di volta in volta dal tipo di informazione che si desidera ottenere.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) BOTHE H., NELLES H., HÄGER K.P., PAPEN H. e NEUER G. (1984) — *Physiology and biochemistry of N_2 -fixation by cyanobacteria*. In: « *Advances in nitrogen fixation research* », VEEGER C. e NEWTON W.E. Eds. NIJHOFF M. e JUNK W. Publs. 199-210.
- (2) SCHUBERT K.R. e EVANS H.J. (1976) — *Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73; 1207-1211.
- (3) MARGHERI M.C., SILI C., VINCENZINI M., BARSANTI L. e MATERASSI R. (1984) — *On the N_2 -fixing efficiency in mass culture of different Azolla spp.* In: « *Advances in nitrogen fixation research* », VEEGER C. e NEWTON W.E. Eds. NIJHOFF M. e JUNK W. Publs. 59.
- (4) VINCENZINI M., MARGHERI M.C. e SILI C. (1985) — *Outdoor mass culture of Azolla spp.: yield and efficiencies of nitrogen fixation*. Plant and Soil. In corso di stampa.
- (5) MINCHIN F.R., WITTY J.F., SHEEHY J.E. e MULLER M. (1983) — *A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions*. J. Exp. Bot. 34; 641-649.

PREPARAZIONE ED USO DEGLI INOCULANTI CIANOBATTERICI NEL SUOLO ED IN RISAIA

L. TOMASELLI, C. SILI, L. GIOVANNETTI, E. PELOSI

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica - Università
e Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - C.N.R. Firenze

RIASSUNTO

L'utilizzazione dei cianobatteri azotofissatori come inoculanti di terreni agricoli, soprattutto coltivati a risaia, ha una lunga tradizione in alcuni paesi asiatici (India, Cina, Filippine, etc.). La preparazione degli inoculi avviene con tecnologie empiriche in sistemi aperti impiegando associazioni di colture non ben definite (*Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*).

Secondo vari AA. nei suoli trattati si conseguono incrementi di resa del 16-18% e una migliore crescita delle piante determinata da sostanze bioattive e fito-ormoni sintetizzati dai cianobatteri.

L'applicazione dei cianobatteri azotofissatori incontra tuttavia notevoli limiti soprattutto per la metodologia empirica con cui è stato affrontato fino ad oggi il problema.

I presupposti per superare tali limitazioni sono prima di tutto la identificazione delle specie più adatte e, nell'ambito di queste, dei ceppi ben caratterizzati nei riguardi della loro ecofisiologia ed efficienza e quindi la realizzazione di sistemi controllati di propagazione dei ceppi e di preparazione degli inoculanti secchi attivi. Questa formulazione si presenta importante e specifica per i cianobatteri azotofissatori in quanto, a differenza degli inoculanti rizobiali, conservano la vitalità allo stato secco.

Infine occorre l'adozione di biotecnologie specifiche di produzione delle biomasse axeniche dei cianobatteri selezionati, rispondenti ai requisiti fondamentali richiesti per la colonizzazione del terreno (rapidità di crescita nel suolo, elevata attività azotofissatrice, resistenza agli stress, competitività nei confronti della microflora indigena, resistenza ai pesticidi etc.).

L'impiego agronomico dei cianobatteri si presenta particolarmente promettente non solo in risaia, ma anche nei terreni coltivati.

SUMMARY

The agronomical application of the nitrogen fixing cyanobacteria is used since centuries in India, China, Philippines etc.

The methodology of cyanobacteria production for the inoculation of soils is empirically realized in open air soil culture employing a multistrain inoculum of *Nostoc*, *Anabaena*, *Calothrix*. As several authors refer results of field experiments, report a yield increase of about 16-18% over the control and suggest that cyanobacteria may produce growth promoting substances for the plants.

The practice of inoculation of soils presents a lot of limits because it is based

on an empiric methodology. To overcome these limits it is firstly necessary to identify the more suitable species and among them to search well characterized strains with regard to their ecophysiology and efficiency; secondly methods of inoculum production and preparation of dry active cyanobacteria in artificially controlled systems must be developed.

At last it is necessary to employ specific biotechnology to produce axenic cyanobacterial biomass having the essential qualifications for the colonization of soil (fast growth in soil, high nitrogen fixation activity, resistance against environmental extremes and pesticides, competition against indigenous microflora). The agronomical use of cyanobacteria is not only full of promise in ricefields but in cultivated soils too.

Introduzione

L'impiego in agricoltura dei cianobatteri azotofissatori liberi e simbiotici costituisce una pratica largamente sperimentata in vari paesi del sud-est asiatico.

La produzione degli inoculanti è tradizionalmente ottenuta con modalità che variano da paese a paese, impiegando associazioni di colture non ben definite. Se si esclude il metodo giapponese (1) che opera con sistemi chiusi, in cui circola la coltura, sia nel sistema indiano (2) che in quello cinese (3) i dispositivi di coltura sono rappresentati da sistemi aperti non controllati. L'« All India Coordinated Project on Algae » raccomanda la preparazione e l'impiego di inoculi ottenuti da colture miste di specie dei generi *Scytonema*, *Nostoc*, *Anabaena* e *Plectonema* in colture su terra all'aria aperta. Le biomasse ottenute con i diversi sistemi vengono essiccate su vari supporti costituiti da terra, sabbia silicea, pomice, ghiaia vulcanica, spugna sintetica.

L'applicazione in campo degli inoculanti cianobatterici contribuisce in modo significativo alla fertilizzazione naturale del terreno: VENKATARAMAN (2) li chiama i fertilizzanti del futuro. Secondo vari autori (4, 5, 6, 7, 8) la sola algalizzazione determina incrementi del raccolto del riso del 16-18%, se l'inoculazione cianobatterica è associata all'impiego di fertilizzanti azotati integrati di fosforo e molibdeno, gli incrementi sono ancora superiori e possono raggiungere oltre l'80% (Tab. 1) (9).

Già nel 1960 nel nostro Centro sono state fatte prove di inoculazione del riso con *Anabaena cylindrica* (10); più recentemente negli anni 1979-1980 in prove da noi effettuate in risaie sperimentali, l'inoculazione del riso con *Anabaena cylindrica*, accompagnata da concimazione azotata ridotta del 40% ha determinato un incremento del prodotto pari al 6% rispetto al controllo con concimazione azotata completa (Tab. 2), FAVILLI et al., 1979-80, dati non pubblicati). Nei confronti delle piante, in presenza di azoto combinato, l'inoculazione con cianobatteri ha permesso di mettere in evidenza effetti fitomonalni come riportato da BALLONI et al. (11, 12), su piante di fragole in idroponica e su coltura di pomodoro (Fig. 1), nonché da JACQ e ROGER (13) e

Tab. 1. — Effetto dell'inoculazione con cianobatteri sulla resa del riso. Ogni valore rappresenta la media di 3 raccolti in ognuno dei quali i valori percentuali sono stati ottenuti da quattro repliche.
(da SUBRAMANYAN et al., 1965)

	Resa in granella	
	Kg . ha ⁻¹	Incremento (%)
Controllo	1536	0
Controllo + cianobatteri *	1810	18
Controllo + (NH ₄) ₂ SO ₄ **	2095	36
Controllo + fertilizzante misto ***	2244	46
Controllo + cianobatteri + fertilizzante misto	2799	82

* 200 g (p.s.) ha⁻¹ miscuglio di *Nostoc*, *Anabaena*, *Scytonema* e *Tolypothrix*.
** 20 Kg ha⁻¹ di N.
*** 10 q ha⁻¹ di calce + 20 ha⁻¹ di P₂O₅ + 0,28 Kg ha⁻¹ di Na molibdato.

VENKATARAMAN (2, 14) su piante di riso. In suoli non coltivati l'algalizzazione ha prodotto un miglioramento della struttura, stabilità e capacità idrica (15, 16, 17, 18), oltre ad una stimolazione dell'attività dei principali gruppi microbici.

Selezione delle specie e dei ceppi di cianobatteri azotofissatori

Poichè la sperimentazione fino ad oggi attuata nella produzione ed impiego di inoculanti cianobatterici ha preceduto e proseguito indipendentemente dalle conoscenze di base di questi microrganismi e dei fattori che ne regolano

Tab. 2. — Effetto dell'inoculazione con *Anabaena cylindrica* sulla crescita e sulla produzione del riso (FAVILLI, dati non pubblicati).

Trattamento	n° culmi . m ⁻²	Peso totale dei culmi g . m ⁻²	Resa in granella g . m ⁻²	Resa in granella (10% di perdita) q . ha ⁻¹
Controllo a concimazione completa	342	3730	980	82,9
Controllo a concimazione ridotta (N 60%)	226	4400	925	75,7
<i>Anabaena</i> + concimazione ridotta (N 60%)	392	5150	1075	88,1
Differenze rispetto al controllo + concimazione ridotta	+ 166	+ 750	+ 150	+ 12,4
Differenze rispetto al controllo + concimazione completa	+ 50	+ 1220	+ 95	+ 5,1

l'interazione con l'ambiente, non sono emersi criteri validi per sfruttare i cianobatteri azotofissatori in tutta la loro potenzialità.

Da questo sorge la necessità di identificare le specie più adatte e di studiarle adottando criteri microbiologici che consentano una valida caratterizzazione per il loro impiego come inoculanti (19). L'isolamento di ceppi axenici, tassonomicamente definiti, è condizione indispensabile se si vuole effettuare



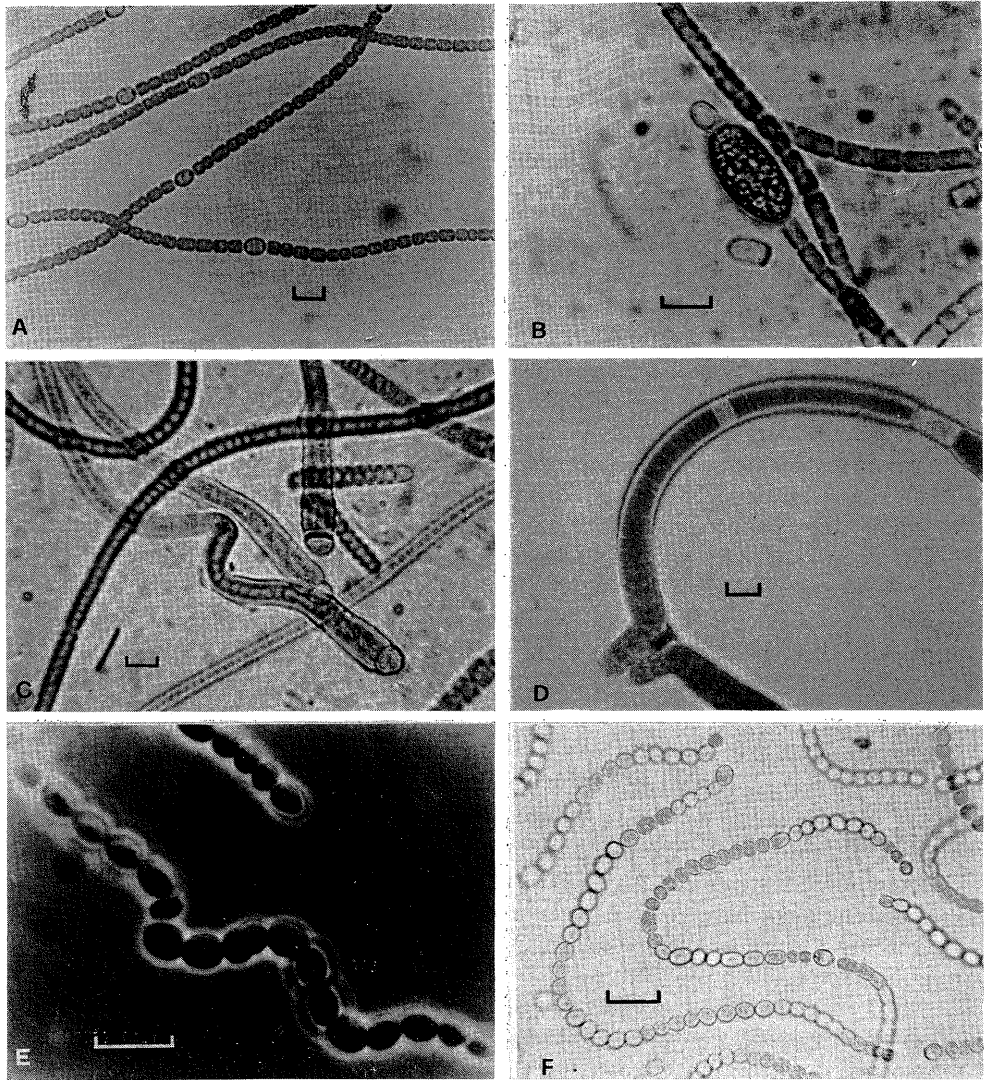
Fig. 1. — Effetti dell'inoculazione con *Anabaena cylindrica* sulla crescita di piante di pomodoro (a sinistra controllo a destra piantine inoculate).

una selezione che consenta di ottenere un inoculante con requisiti idonei sia da un punto di vista ecofisiologico che biochimico.

La selezione della specie e del ceppo deve essere effettuata a livello del tipo di suolo per il quale sarà destinato. Dalle ricerche finora effettuate sono emerse indicazioni sull'affinità di determinate specie per alcuni tipi di suoli.

Per i terreni idromorfi la scelta va indirizzata verso specie planctoniche di *Anabaena* e *Cylindrospermum* che grazie alla presenza di gas vacuoli possono galleggiare, portandosi più o meno vicini alla zona fotica (Tav. 1 a, b).

Per i suoli aridi e calcarei presentano buoni requisiti specie di *Calothrix* e *Scytonema*, particolarmente resistenti a condizioni di siccità (Tav. 1 c, d), come *S. hotmannii* che è in grado di crescere anche ad un tenore pari al 40% della capacità idrica del suolo (20). La presenza di ampie guaine mucillaginose, di numerosi ormogoni ed acineti e la capacità fotoeterotrofica e chemioeterotrofica, consentono alle specie del genere *Nostoc* il superamento di stress idrici e termici, rendendole le più idonee per l'insediamento nei suoli ed in particolare in quelli neutri ed argillosi (Tav. 1 e, f).



Tav. 1. — Aspetto micromorfologico di: a) *Anabaena cylindrica*; b) *Cylindrospermum* sp.; c) *Calotrix elenkinii*; d) *Scytonema* sp.; e) *Nostoc linckia*; f) *Nostoc carneum*. (barra = 10 μ).

Una volta selezionato il ceppo più idoneo alle condizioni pedologiche del terreno perchè questo alligni e sia attivo è necessario che oltre alle caratteristiche, di cui sopra, possenga, analogamente agli altri inoculanti:

- rapidità di colonizzazione del substrato;
- competitività nei confronti della microflora indigena;
- elevata attività nitrogenasica;
- sopravvivenza nel supporto.

Una volta selezionati diversi ceppi con caratteristiche differenziate si può realizzare o l'inoculazione con un solo ceppo o l'impiego di una associazione multistipite di specie e generi diversi, ben caratterizzati soprattutto per quanto concerne il loro sinergismo.

L'attitudine associativa di alcuni ceppi di *Nostoc* (*N. commune*, *N. muscorum*, *N. paludosum*) nei confronti delle radici di plantule di graminacee e di leguminose (riso, grano, trifoglio, medica) e la possibilità di ottenere ceppi con gene *nif* derepresso (21), quindi capaci di fissare anche in presenza di N combinato costituiscono in prospettiva una valida promessa.

La selezione del ceppo e il mantenimento delle sue caratteristiche è una tappa molto importante nella biotecnologia degli inoculanti, in quanto nella fase di produzione non è possibile effettuare miglioramenti qualitativi.

Per ottenere biomassa cianobatterica in quantità sufficiente per l'impiego nella inoculazione è necessario produrla realizzando colture massive secondo principi di tecnologie fotosintetiche specifiche.

Produzione di inoculanti

Fondamentale per la produzione di inoculanti è l'adozione, fra i numerosi mezzi di coltura per i cianobatteri azotofissatori (7) di quello che, oltre a determinare tassi di crescita elevati, consenta, lo sviluppo sotto forma di sospensione omogenea, come pure la standardizzazione della concentrazione dell'inoculo, del rifornimento della CO₂, dell'intensità luminosa e della temperatura.

I sistemi colturali aperti, sui quali si è basata fino ad oggi la produzione dei paesi asiatici, non consentono l'ottenimento di biomasse prive di contaminanti, aventi le stesse caratteristiche dei ceppi di partenza. Queste esigenze possono essere rispettate usando sistemi colturali chiusi.

Nella fase iniziale, per le colture di avviamento, viene utilizzato un dispositivo costituito da una serie di reattori di forma cilindrica con volumi colturali di 1-3 litri, muniti di una barra magnetica che impartisce la turbolenza necessaria al mantenimento di una omogenea sospensione cellulare. Un

elettrodo pH-metrico, immerso nella coltura e collegato ad un dispositivo pH-statico, comanda l'immissione della CO_2 nel momento in cui il pH supera il valore prestabilito, mentre un rilevatore di ossigeno disciolto regola l'immissione di aria per allontanare l' O_2 formatosi. Tale dispositivo è termoregolato ed in condizioni di luce controllata.

Le colture ottenute in questa prima fase di laboratorio, vengono impiegate per allestire i reattori destinati alla preparazione degli inoculanti per la coltura in campo.

I tipi di reattori finora sperimentati sono costituiti o da dispositivi tubolari a circuito orizzontale o da recipienti di forma cilindrica disposti verticalmente e dotati di termoregolazione. Nel primo caso, il reattore è costituito da un sistema di 10 tubi trasparenti di 5 cm di diametro e di 200 cm di lunghezza ciascuno, paralleli tra di loro e collegati alle estremità da una serie di curve. Il circuito tubolare, disposto orizzontalmente per ottenere un miglior sfruttamento della luce, ha un volume complessivo di 50 litri, il movimento della coltura è assicurato da una pompa. La coltura è insufflata con aria più CO_2 al 2% (Fig. 2).

Nel secondo caso il reattore, in materiale trasparente (vetro o plexiglass) del diametro di 10 cm, permette di lavorare con volumi colturali di 10-15 litri. L'agitazione è assicurata dalla immissione di una miscela sterile di aria più CO_2 al 2% al tasso di 10 litri min^{-1} (Fig. 3).

Le colture in pieno campo vengono realizzate utilizzando, come si può vedere dalla figura (Fig. 4), un sistema a collettori solari costituito da tubi di materiale trasparente (polietilene flessibile o plexiglass), del diametro di 13 cm, paralleli uno all'altro e uniti da curve di materiale rigido. La coltura, rifornita di CO_2 , è mantenuta in agitazione mediante pompa a membrana di portata dimensionata al volume del circuito.

Riguardo al dimensionamento il sistema è piuttosto versatile e consente la realizzazione di circuiti adattabili alle condizioni delle superfici su cui devono essere installati.

Su una superficie di 150 m^2 si può installare un circuito con volume colturale di 1200-1300 litri per la cui agitazione è sufficiente una pompa con portata di 6000-7000 litri ora^{-1} .

Questo tipo di impianto, oltre ad assicurare il controllo della contaminazione delle colture, offre il vantaggio della contenuta evaporazione, dell'allungamento del periodo colturale per effetto serra e di una più uniforme insolazione.

Lo schema di un prototipo di impianto per la produzione di inoculanti cianobatterici è riportato in Fig. 5. In questo sono illustrate le varie fasi di produzione a partire dalla moltiplicazione dell'inoculo (punto 1), coltura mas-

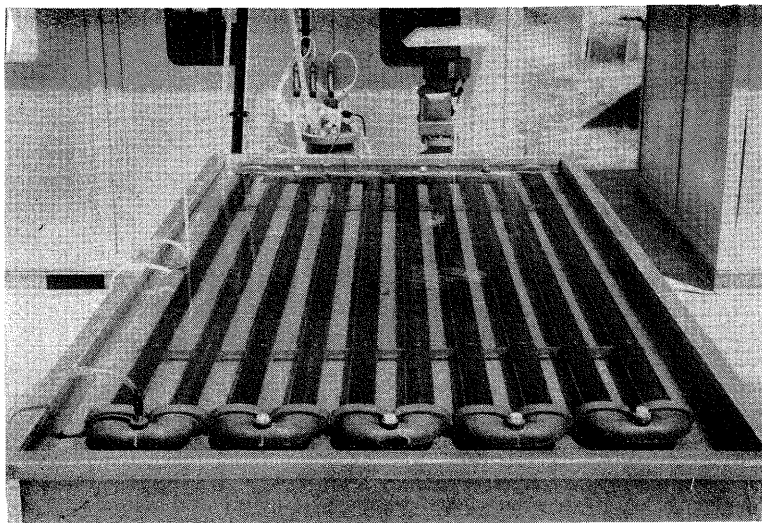


Fig. 2. — Dispositivo tubolare a circuito orizzontale.

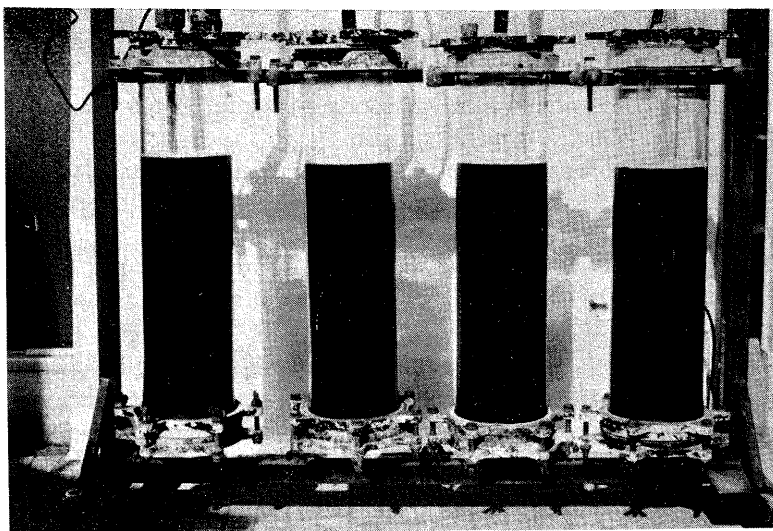


Fig. 3. — Serie di reattori a forma cilindrica.

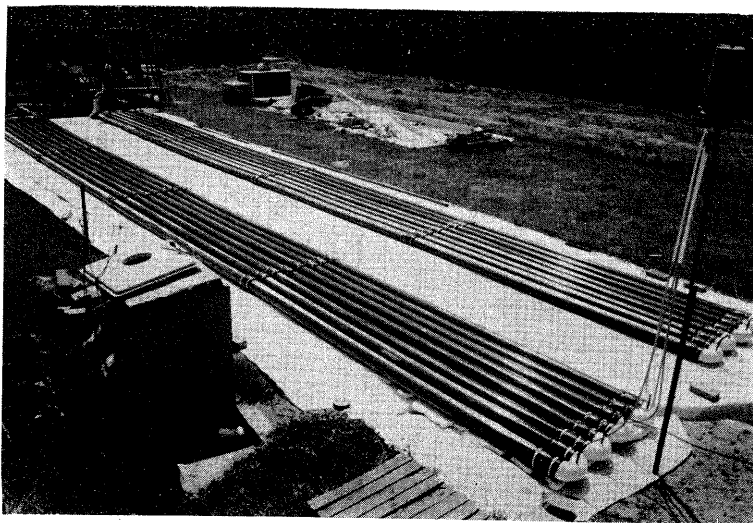


Fig. 4. — Sistema a collettori solari.

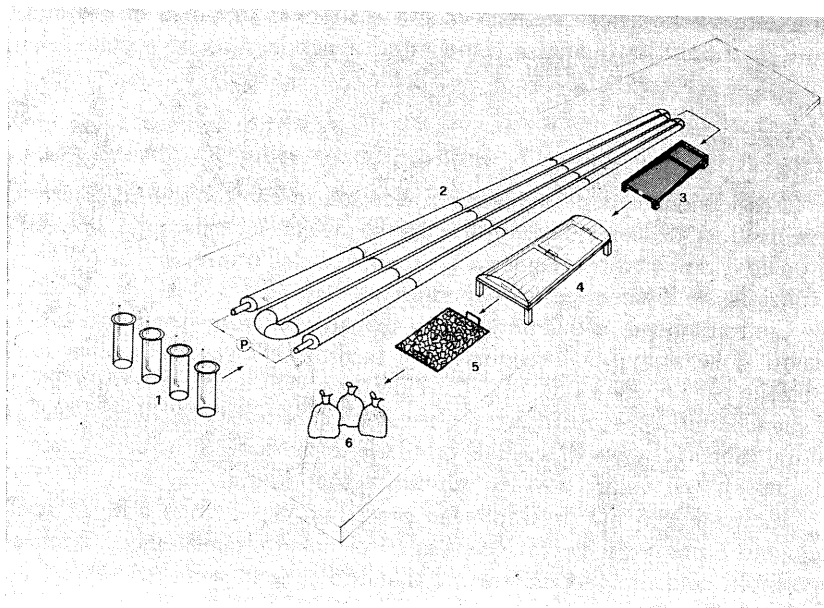


Fig. 5. — Prototipo di un impianto per la produzione di inoculanti cianobatterici: 1) reattori di forma cilindrica; 2) collettori solari; 3) sistema di filtrazione; 4) sistema di essiccazione; 5) pannello per la supportazione degli inoculanti; 6) conservazione.

siva (punto 2), raccolta (punto 3), supportazione ed essiccamento (punti 4 e 5) ed infine conservazione degli inoculanti (punto 6).

La raccolta delle biomasse di cianobatteri azotofissatori prodotte in coltura massiva nel circuito tubolare si effettua mediante filtrazione e lavaggio su teli di nylon a porosità variabile da 20 a 60 μm in funzione delle dimensioni cellulari dei ceppi impiegati. La biomassa così ottenuta viene direttamente essiccata e/o supportata.

FORMULAZIONE DEI PREPARATI DA INOCULARE

Supportazione

La biomassa prodotta prima di essere essiccata viene supportata. In base a precedenti esperimenti (22) è risultato che i supporti più idonei, diversamente da quanto avviene per alcuni azotofissatori eterotrofi, non sono costituiti da torba, ma da colloidali inorganici quali varie argille (caolinite, illite, montmorillonite ecc.) o dalla stessa terra previamente lavata, vagliata ed essiccata. Nel prototipo di impianto un sottile strato di supporto precedentemente sterilizzato viene disteso su telai mobili e sopra il supporto viene uniformemente distribuita la biomassa cianobatterica per la successiva essiccazione.

Essiccamento

L'essiccamento delle biomasse si effettua in controcorrente di aria calda secca a 40-50°C. Con questa procedura si ottiene un miscuglio polverulento nel quale il rapporto tra biomassa e supporto è dell'ordine di 1 a 1 o di 1 a 2 in funzione dello spessore del supporto.

Contrariamente a quanto avviene per altri microrganismi essiccati come i lieviti dove l'umidità consigliata per facilitare l'instaurarsi dello stato di anabiosi e per impedire i danni della reidratazione è compresa tra il 6-8% (23), nei cianobatteri, per intrinseche e peculiari caratteristiche di resistenza alla disidratazione (assenza di vacuoli cellulari, formazione di acineti, guaine mucillaginose), tali valori possono ulteriormente ridursi.

Inoltre questi preparati, almeno per taluni ceppi, sono a lunga scadenza in quanto è una prerogativa specifica dei cianobatteri mantenersi vitali anche dopo molti anni di essiccamento. Al riguardo ci sono segnalazioni di ceppi di *Nostoc* che sono risultati attivi dopo ben 80 anni di permanenza allo stato secco (24). Anche numerose specie di *Nostoc* da noi saggiate hanno ripreso la loro completa attività metabolica dopo 4 anni di essiccamento su terra (Fig. 6).

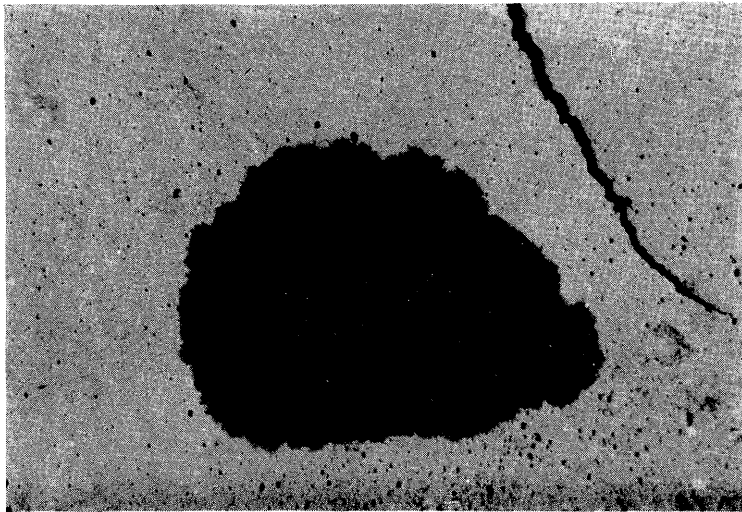


Fig. 6. — Colonia di *Nostoc spongiaeforme* dopo 4 anni di essiccamento su terra.

Produttività delle colture

Le rese medie da noi ottenute in colture all'aperto su specie dei generi *Anabaena*, *Nostoc* e *Calothrix* sono dell'ordine di $9-10 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$. Con un ceppo di *Nostoc punctiforme* sono state ottenute produttività di $12,2 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ (Tab. 3).

Le rese ottenute sono riferite prevalentemente a sistemi aperti. Poiché

Tab. 3. — Produttività media di ceppi cianobatterici azotofissatori in coltura massiva all'aperto.

ORGANISMO	Resa della coltura ($\text{g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$)	Sistema
<i>Anabaena cylindrica</i> 124	8,6	aperto
<i>A. variabilis</i> 104	9,0	aperto
<i>Calothrix elenkinii</i> 17 Som 1	9,0	chiuso
<i>C. sp.</i> 109 (ex <i>Tolypothrix tenuis</i>)	8,0	aperto
<i>Fischerella sp.</i> 203 L (ex <i>Mastigocladus laminosus</i>)	8,0	aperto
<i>Nostoc commune</i> 40	7,9	aperto
<i>N. linckia</i> 35	7,5	aperto
<i>N. punctiforme</i> 110 L	10,7	aperto
<i>N. punctiforme</i> C 17 Som	12,2	chiuso
<i>N. rivulare</i> 107	11,0	aperto

utilizzando dispositivi colturali tubolari a sistema chiuso è stato accertato, in altri cianobatteri filamentosi non eterocistati, un aumento della produttività, si può ipotizzare anche in questo caso un incremento della resa media.

Considerando quindi una produttività media di $12 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ si possono ottenere fino a 30 tonnellate di biomassa per ettaro, per anno, ed alle nostre latitudini in un periodo utile di 100 giorni circa $12 \text{ t ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$. Visto che la sola somministrazione di 5 Kg ha^{-1} di inoculante cianobatterico è sufficiente a produrre incrementi delle rese compresi mediamente fra 16-18%, la produzione ottenuta da un sistema colturale di 1 ha di superficie può soddisfare l'esigenza di 2400-6000 ha di terreno coltivato.

Utilizzazioni agronomiche

Gli inoculanti cianobatterici, analogamente a quanto già avviene per la batterizzazione delle leguminose con *Rhizobium* spp., possono essere utilizzati mediante applicazione diretta quando vengono fatti aderire al seme poco tempo prima della semina o mediante quella indiretta quando vengono applicati al terreno indipendentemente dal seme. Con il primo sistema i semi vengono preventivamente bagnati con una soluzione (15%) di gomma arabica o di carbossimetilcellulosa (1,5%) e quindi miscelati con gli inoculanti che possono essere usati sia in forma polverulenta e secca sia sotto forma di pasta semi-solida dopo averli risospesi in una piccola quantità di acqua (Fig. 7).

Mentre il trattamento a secco consente di allungare i tempi di impiego

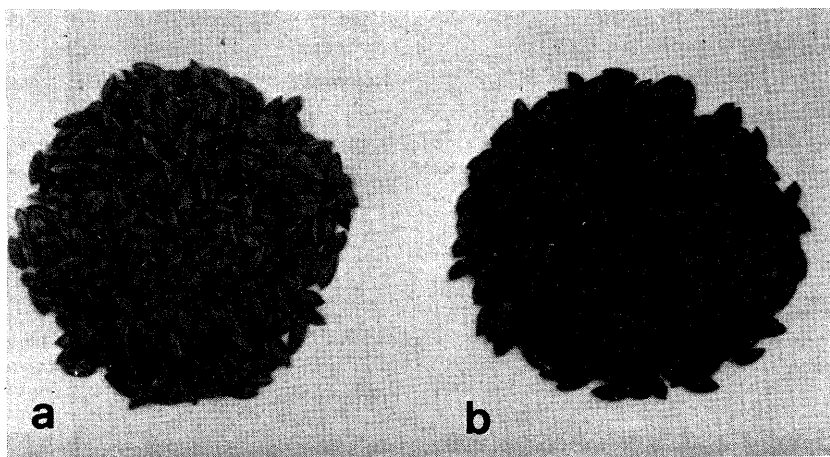


Fig. 7. — Semi di riso cianobatterizzati con: a) *Anabaena cylindrica*; b) *Nostoc muscorum*.

in campo dei semi trattati, quello semi-solido implica una loro tempestiva utilizzazione nell'arco delle 48 ore.

Anche con il metodo di applicazione indiretta gli inoculanti vengono distribuiti nel terreno sia in forma secca che in forma umida. In ambedue i casi la loro somministrazione può avvenire o in maniera localizzata con la seminatrice automatica, al momento della semina, o a pieno campo con lo spandiconcime.

Conclusioni

La cianobatterizzazione dei suoli agricoli costituisce un reale vantaggio economico in quanto determina un incremento della produttività con risparmio di fertilizzante azotato.

Gli inoculanti cianobatterici avendo la capacità di insediarsi definitivamente nel terreno, possono, dopo una somministrazione iniziale ripetuta per tre anni, prostrarre nel tempo i loro effetti positivi.

Con l'uso di inoculanti cianobatterici e quindi con la diminuzione dell'impiego di fertilizzanti azotati di sintesi si possono limitare anche alcune alterazioni ambientali: aumento della concentrazione dei nitrati nelle acque di superficie ed i connessi fenomeni eutrofici; aumento delle perdite di N disponibile per le piante, per incremento dei processi di denitrificazione con conseguente riduzione dello strato di ozono nell'atmosfera.

Le nuove prospettive di produzione degli inoculanti cianobatterici e la possibilità della loro conservazione allo stato secco per lungo tempo, mantenendo elevato il tasso di vitalità, costituiscono una premessa per rendere la pratica della cianobatterizzazione proficua, di larga applicazione ed ecologicamente valida.

Tuttavia l'attuale stato della ricerca biotecnologica nell'impiego agricolo dei cianobatteri azotofissatori è ancora lontano da quello attuato per l'inoculazione rizobiale ed associativa, per cui è auspicabile colmare nel più breve tempo possibile questo divario.

BIBLIOGRAFIA

- (1) WATANABE A. (1959) — *On the mass culturing of a nitrogen fixing blue-green algae Tolypothrix tenuis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 5, 85.
- (2) VENKATARAMAN G.S. (1975) — *The role of blue-green algae in tropical rice cultivation*. In: *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*, STEWART W. D.P. (ed.). Cambridge Univ. Press., 207.
- (3) HAMDI Y.A. (1982) — *Application of nitrogen-fixing systems in soil improvement and management*. FAO Soils Bulletin n° 49, 45. Rome.
- (4) DE P.K., SULAIMAN M. (1950) — *Fixation of nitrogen in rice soils by algae as influenced by crop carbon dioxide and inorganic substances*. Soil Sci. 70, 137.

- (5) WATANABE A., YAMAMOTO Y. (1970) — *Mass culturing preservation and transportation of the nitrogen fixing blue-green algae*. In: Proc. 2nd Symp. on Nitrogen fixation and Nitrogen Cycle, Sendai, Japan 22.
- (6) SINGH P.K. (1979) — *Use of Azolla in rice production in India*. In: Nitrogen and rice symposium, IRRI, Los Banos, Laguna, Philippines, 407.
- (7) STEWART W.D.P. (1980) — *Systems involving blue-green algae (Cyanobacteria)*. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. BERGERSEN F.J. (ed.) WILEY J. & Sons Pubs., 583.
- (8) SWAMINATHAN M.S. (1982) — *Biotechnology research and third world agriculture*. Science 218, 967.
- (9) SUBRAHAMANYAN R., MANNA G.B., PATNAIK S. (1965) — *Preliminary observations on the interaction of different rice soil types to inoculation of blue-green algae in relation to rice culture*. Proc. Indian. Acad. Sci. B 62, 171.
- (10) FLORENZANO G., BALLONI W., MATERASSI R. (1960) — *Le microalghe verdi-azzurre azotofissatrici e la fertilità del terreno delle risaie*. Atti III Symp. Intern. Agrokimica, Siviglia, 576.
- (11) BALLONI W., CELESTRE M.R., FAVILLI F., MARGHERI M.C. (1972) — *Influenza dell'algalizzazione sulla crescita della fragola in coltura idroponica*. Atti Colloquio SISS. Rapporti piante microorganismi, 199.
- (12) BALLONI W., MARGHERI M.C., MATERASSI R., PUSHPARAJB B. (1975) — *Interazioni piante microalghe*. Contributo sperimentale. Ann. Acad. Econ. Agraria Georgofili. XXI, 1.
- (13) JACQ V., ROGER P.A. (1977) — *Decrease of losses due to sulphate reducing processes in spermosphere of rice by presoaking seeds in a culture of blue-green algae*. Cah. ORSTOM, Sér. Biol. 12, 101.
- (14) VENKATARAMAN G.S. (1979) — *Algal inoculation of rice fields*. In: Nitrogen and rice symposium, IRRI, Los Banos, Laguna Philippines, 311.
- (15) SINGH R.N. (1961) — *Role of blue-green algae in Nitrogen Economy of India Agriculture*. Ind. Counc. Agric. Res., New Delhi, 175.
- (16) SHIELD L.M., DURREL L.W. (1964) — *Algae in relation to soil fertility*. Bot. Rev. 30, 93.
- (17) IBRAHIM A.N., KAMEL M., EL-SHERBENY M. (1971) — *Effect of inoculation with alga Tolypothrix tenuis on the yield of rice and soil nitrogen balance*. Agrokem. Talagtan 20, 389.
- (18) FAVILLI F., CAROPPO S., MATERASSI R. (1977) — *Su un esperimento di algalizzazione di un suolo argilloso*. Ann. Microbiol. 27, 101.
- (19) FLORENZANO G. (1984) — *I cianobatteri azotofissatori e le biotecnologie applicate al loro sfruttamento*. Ann. Accad. Agric. Torino.
- (20) CAMERON R.E., FULLER W.H. (1960) — *Nitrogen fixation by some soil algae in Arizona soils*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 24, 353.
- (21) SINGH H.N., SINGH HARIHAR NATH (1978) — *An azide-resistant mutant of the blue-green alga Nostoc muscorum producing heterocyst and nitrogenase in the presence of fixed inorganic nitrogen source*. Arch. Microbiol. 119, 197.
- (22) FILPI C., PELOSI E., TORZILLO G. (1980) — *Produzione di inoculanti cianobatterici su acque reflue*. Atti XIX Cong. Naz. Microbiol., Catania, 401.
- (23) FLORENZANO G. (1968) — *Il ruolo dei lieviti nella determinazione della composizione chimica e dei caratteri organolettici dei vini*. Vini d'Italia 57, 1.
- (24) ROGER P., REYNAUD P. (1982) — *Free-living blue-green algae in tropical soils*. In: Microbiology of tropical Soils and Plant productivity. DOMMERGUES Y., DIEM H.G. (eds) Nijhoff. Junk Pubs 147.

INFLUENZA DEGLI INIBITORI DI NITRIFICAZIONE SULLA MINERALIZZAZIONE DEL CARBONIO E DELL'AZOTO NEL SUOLO

L. GOLDBERG FEDERICO, A. FARINI, M.V. VANDONI

Istituto di Chimica Agraria - Università, Milano.

RIASSUNTO

È stata condotta una serie di prove di incubazione allo scopo di verificare se e in che misura la 2-cloro-6-triclorometilpiridina e la diciandiamide influenzano, oltre la nitrificazione, anche la mineralizzazione del carbonio e dell'azoto. Le prove sono state effettuate su due terreni. I due inibitori non hanno modificato l'erogazione di CO_2 . Al contrario per uno dei due suoli è stata accertata, in presenza di inibitori, una più accentuata mineralizzazione dell'azoto organico.

SUMMARY

A series of experimental test has been conducted on two soils to verify the influence of 2-cloro-6-triclorometilpyridine and dyciandiamide beside the nitrification, the carbon and nitrogen mineralization. The two inhibitors did not modify the CO_2 release. For what concern nitrogen, one of the test soil showed in the presence of the inhibitors, a more pronounced mineralization of organic nitrogen.

Durante gli ultimi decenni, l'utilizzazione dei concimi azotati ha subito una continua evoluzione.

Prima della seconda guerra mondiale il loro consumo era relativamente basso. Dopo la guerra, l'immissione sul mercato di quantità cospicue di fertilizzanti azotati — soprattutto nitrato ammonico — portò, dopo un periodo di cautela dettata da ragioni economiche, ad una loro sempre crescente utilizzazione, facilitata dalla comparsa di prodotti relativamente meno cari come l'ammoniaca anidra e dai risultati decisamente positivi ottenuti nella pratica agricola.

In realtà si prendeva in considerazione unicamente l'aumento della resa produttiva e non l'efficienza dei singoli concimi, non si valutava cioè quanto dell'azoto somministrato passasse realmente nella coltura. Tanto è vero che la proposta di Goring, formulata nel 1962, di usare la 2-cloro-6-tricloro-metil-

piridina come inibitore della nitrificazione per incrementare l'efficienza dei concimi azotati non destò alcun interesse per una decina d'anni, fino a quando cioè la necessità di ridurre i consumi energetici ha riproposto il problema di utilizzare al meglio l'azoto dei fertilizzanti.

Attualmente si assiste ad un vero e proprio revival degli studi sugli inibitori della nitrificazione che peraltro sono volti a risolvere problemi di carattere ambientale più che problemi di natura agronomica.

In condizioni di campo la coltura utilizza non più del 50-60% dell'azoto somministrato con i concimi: quanto più alte sono le dosi tanto più bassa è, proporzionalmente, la quantità di azoto assimilato. Inoltre il massimo di risposta della coltura per unità di fertilizzante e la più elevata utilizzazione dell'azoto somministrato spesso non coincidono con la dose ottimale da un punto di vista economico.

La bassa efficienza dei fertilizzanti azotati è principalmente conseguenza delle molte reazioni chimiche, fisiche e biologiche che portano a cospicue perdite di azoto dal sistema suolo-pianta.

L'azoto viene perso a causa del rilascio e della volatilizzazione di ammoniaca dall'urea, dai sali ammoniaci, dai residui organici, dai liquami zootecnici; a causa di reazioni chimiche tra nitriti e ione ammonio, tra nitriti e amminiacidi (con produzione di azoto elementare); tra nitriti e lignina, tra nitriti e fenoli (con produzione di azoto elementare e protossido di azoto). Ma il meccanismo quantitativamente più importante e di maggior significato nella pratica agricola è indubbiamente il processo di denitrificazione, vale a dire la trasformazione biologica dei nitriti e nitrati in azoto elementare e/o protossido d'azoto. Quest'ultimo processo che teoricamente dovrebbe svolgersi in condizioni di stretta anaerobiosi avviene in realtà anche in micrositi anaerobici in terreni caratterizzati da valori di potenziali ossido-riduttivi relativamente elevati.

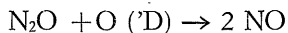
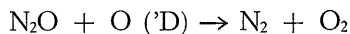
Inoltre, recenti ricerche hanno evidenziato che il protossido d'azoto si può formare anche durante la nitrificazione cioè in condizioni aerobiche con un meccanismo non ancora completamente chiarito.

La perdita come protossido d'azoto di una parte dell'elemento somministrato con i fertilizzanti non ha soltanto un risvolto economico. Molto più gravi — questa volta sotto un profilo ecologico — sono gli effetti che esso e gli ossidi superiori esercitano sulla strato di ozono presente nella stratosfera, che ha la funzione di proteggere la superficie terrestre dalle radiazioni ultraviolette.

L'ozono, che si forma nella stratosfera per fotolisi dell'ossigeno molecolare operata dalle radiazioni ultraviolette a più bassa lunghezza d'onda, reagisce con l'ossido d'azoto formando ipoazotide e ossigeno molecolare:



Il protossido, trasportato nella stratosfera dalle correnti d'aria, reagisce con singoli atomi di ossigeno prodotti dalla fotolisi delle molecole di ozono:



producendo l'ossido di azoto che reagisce direttamente, come detto in precedenza, con l'ozono.

Fortunatamente da conti fatti risulterebbe che, rimanendo costanti gli attuali flussi di protossido d'azoto dall'ambiente terrestre ed acquatico verso l'atmosfera, si dovrebbe verificare, tra il 21° e 22° secolo, una riduzione dello strato di ozono, compresa tra l'1,5 ed il 3% del totale.

Altro effetto negativo dei nitrati, anche in questo caso sotto il profilo ecologico, è l'inquinamento delle acque profonde e l'eutrofizzazione dei corpi idrici superficiali conseguenti al loro dilavamento.

Dato che l'elevata concentrazione di nitrati nelle soluzioni del suolo è determinante sia per le perdite gassose che per il dilavamento, è evidente il perché gli studi sulla possibilità di inibire o quanto meno rallentare la nitrificazione sono ancora estremamente attuali.

Sulla base di tali considerazioni, gli Istituti di Chimica Agraria di Milano e di Piacenza hanno impostato una serie di prove di campo, di serra e di laboratorio allo scopo di identificare l'inibitore, le dosi e le modalità di impiego più idonee a migliorare l'efficacia dei fertilizzanti azotati nella realtà agricola lombarda; ma anche e direi soprattutto per chiarire se l'uso degli inibitori può portare ad un'alterazione dell'attività biotica del suolo. In particolare, dato il fitto intreccio esistente tra i vari processi interessati al metabolismo pedologico dell'azoto, lo studio prende in considerazione gli effetti dell'inibitore, oltre che sulla nitrificazione, sulla mineralizzazione dell'azoto organico, la riduzione assimilatoria dei nitrati, la denitrificazione, l'attività ureasica.

In questa sede vengono riferiti alcuni dei risultati acquisiti nel corso di esperienze intese ad evidenziare gli eventuali effetti della 2-cloro-6-triclorometil-piridina e della diciandamide sulla mineralizzazione dell'azoto e del carbonio organico.

Tali risultati sono stati ottenuti operando su due suoli prelevati negli appezzamenti dove sono state effettuate le prove in campo. I due suoli avevano la seguente composizione:

Suolo 1 (Piacenza): pH = 6,3; sostanza organica = 1,7%; azoto organico = 0,13%; P₂O₅ assimilabile (metodo Olsen) = 57 mg/kg; K₂O scambiabile (ammonio acetato) = 140 mg/kg; C.S.C. = 17,0 meq/100g; sabbia = 61%; limo = 23%; argilla = 15%.

Suolo 2 (Lodi): pH = 6,4; sostanza organica = 2,2%; azoto orga-

nico = 0,17%; P_2O_5 assimilabile (metodo Olsen) = 305 mg/kg; K_2O scambiabile (ammonio acetato) = 148 mg/kg; C.S.C. = 18 meq/100g; sabbia = 62%; limo = 31%; argilla = 7%.

Sulla base di numerose esperienze precedenti, la mineralizzazione dell'azoto organico è stata seguita misurando a opportuni intervalli di tempo l'azoto ammoniacale e quello nitrico formatosi in aliquote di suolo (g 20) portate al 50% della capacità idrica e addizionate di peptone Merck nella misura di 500 ppm di azoto. Incubazione a 25°C. Dosaggio delle due forme di azoto con elettrodi specifici negli estratti ottenuti trattando il suolo con acqua (azoto nitrico) e successivamente con $KCl\ N$ (azoto ammoniacale).

L'emissione di CO_2 , espressione della capacità mineralizzatrice dei co-

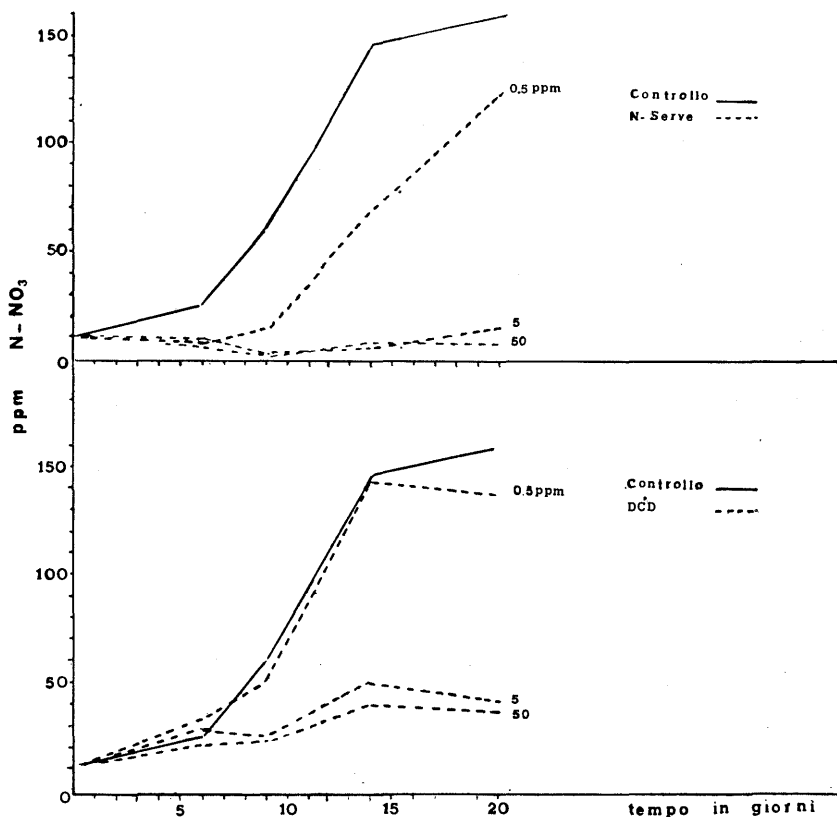


Fig. 1. — Nitrificazione in presenza di inibitori - suolo 1.

stituenti organici, è stata misurata con il metodo di Saive opportunamente modificato. Si è operato su aliquote di 60 g di suolo portato al 50% della capacità idrica in recipienti da un litro chiusi. Dosaggio della CO_2 prodotta mediante titolazione con HCl, in presenza di fenoftaleina, di una soluzione di NaOH 0,5 N posta in un becker posto all'interno del contenitore.

L'esame dei dati ottenuti consente le seguenti considerazioni:

— I due terreni molto simili da un punto di vista chimico si differenziano invece per quanto concerne l'attività biotica.

— Nel suolo 1 in 20 giorni si è ossidata una quantità di azoto ammoniacale leggermente superiore (64% del teorico) a quella registrata per il suolo 2 (54% del teorico) (fig. 1 e 2).

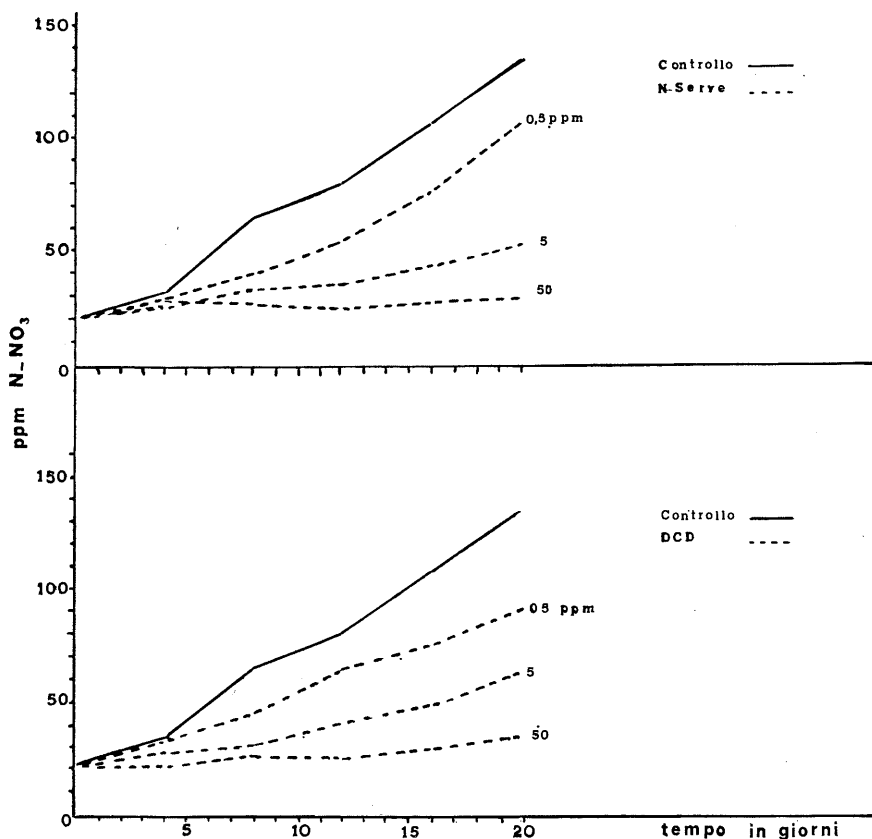


Fig. 2. — Nitrificazione in presenza di inibitori - suolo 2.

— Sia l'N-serve che la DCD alle dosi di 5 e 50 ppm evidenziano una netta azione inibente per il suolo 1. La loro azione è meno spiccata per il suolo 2 (fig. 1 e 2).

— Il suolo 2 è apparso caratterizzato da una capacità mineralizzatrice superiore a quella osservata per il suolo 1. Nella prova testimone si è raggiunto

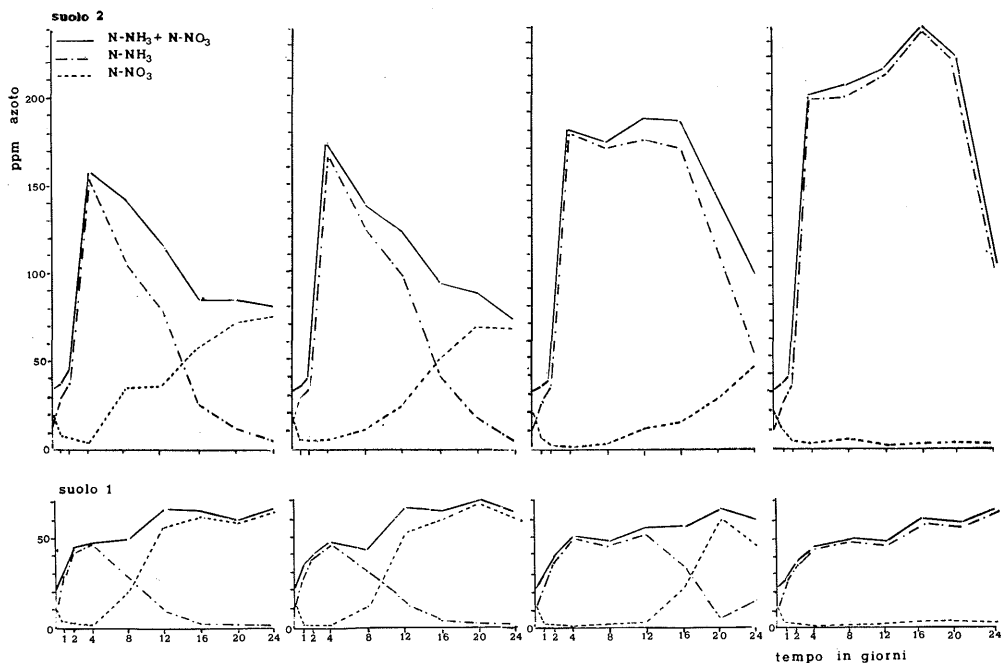


Fig. 3. — Andamento della mineralizzazione dell'azoto organico in due suoli in presenza di 0-0,5-5-50 ppm di N-Serve.

infatti un massimo di azoto minerale totale pari al 24% dell'azoto del peptone aggiunto come substrato contro il 9% riscontrato nel suolo 1 (fig. 3 e 4).

— Mentre per il suolo 1 l'azoto minerale totale rimane costante durante i 24 giorni di incubazione, per il suolo 2 si registra un massimo al quarto giorno e successivamente una brusca, notevole diminuzione. Non siamo in grado per ora di stabilire se il consumo delle due forme di azoto è conseguenza di processi di immobilizzazione da parte di qualche gruppo microbico o vere e proprie perdite gassose dovute a denitrificazione.

— Nel suolo 1 la presenza di inibitori non modifica sostanzialmente il tenore in azoto minerale totale anche se, ovviamente, modifica i rapporti fra le due forme di azoto.

Al contrario, per il suolo 2, la presenza di inibitori provoca un sensibile aumento della quota di azoto mineralizzato. Si passa infatti dal 24% del testi-

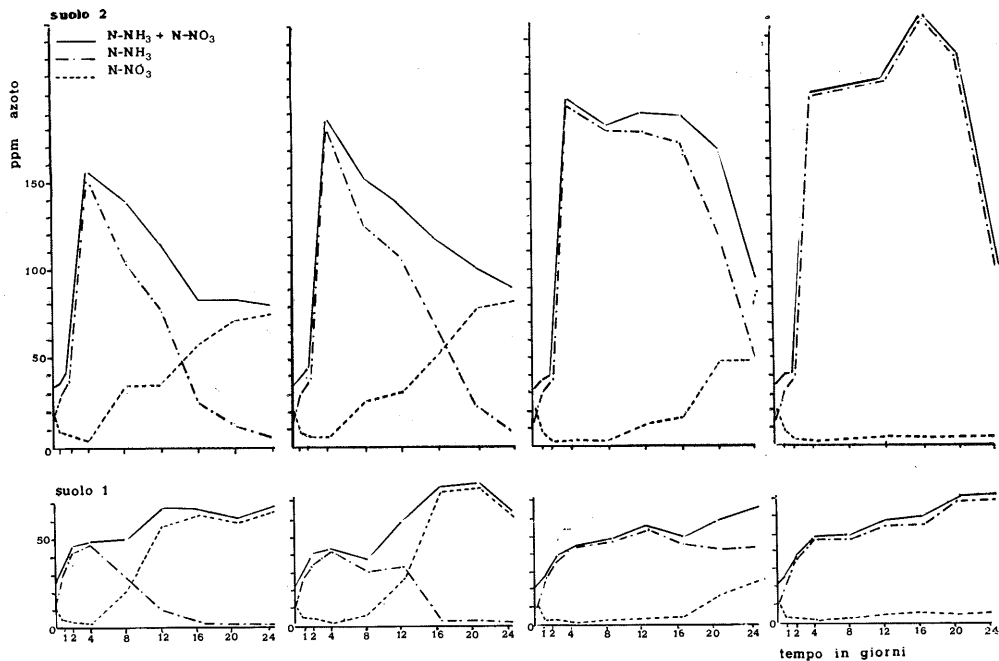


Fig. 4. — Andamento della mineralizzazione dell'azoto organico in due suoli in presenza di 0-0,5-5-50 ppm di DCD.

mone, al 26% con la prima dose, al 30% con la seconda, al 40% del teorico con la terza dose. I due prodotti hanno agito praticamente nella stessa misura.

— I risultati acquisiti sono di notevole interesse; prima di tutto perchè evidenziano una netta differenza di comportamento biologico di suoli molto simili per composizione chimica, tessitura e storia agronomica (ambidue a monocoltura di mais da qualche anno). In secondo luogo perchè dimostrano che gli inibitori saggianti non limitano la loro azione alla nitrificazione, ma influenzano altresì altri processi biologici, nel caso specifico la mineralizzazione

dell'azoto organico. Sarà da stabilire se ciò rappresenta un vantaggio od uno svantaggio.

— La mineralizzazione del carbonio non sembra invece risentire in misura apprezzabile della presenza di nitropirina e di diciandamide (fig. 5).

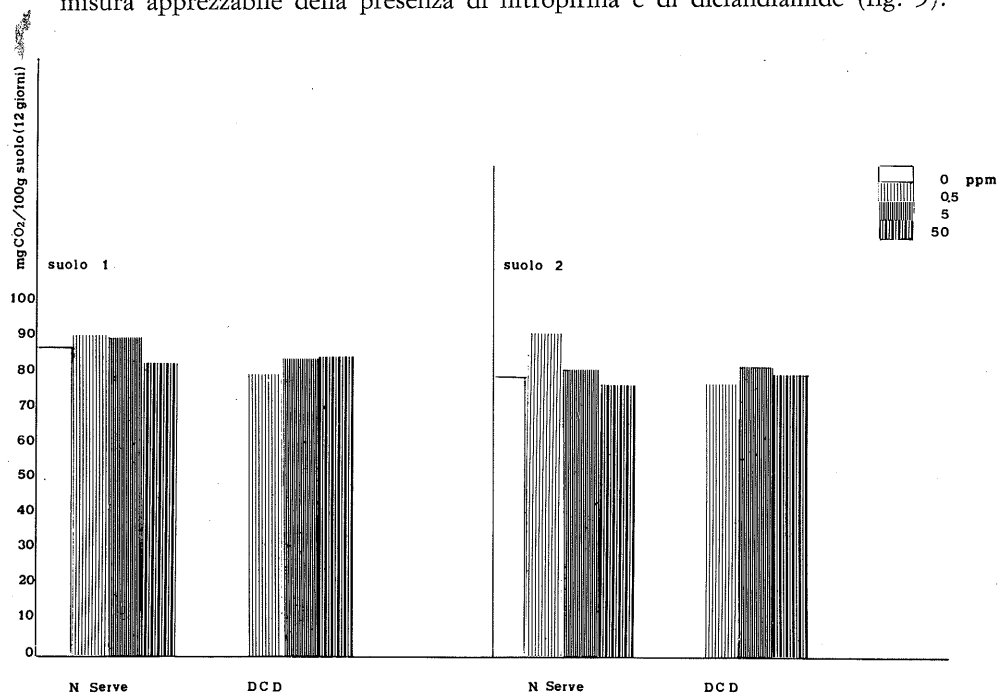


Fig. 5. — Mineralizzazione del carbonio in presenza di inibitori.

REGOLAZIONE DELL'ATTIVITÀ NITRIFICANTE NEL SUOLO

F. CRESCENZI, F. LONGOBARDI, J. SHEJBAL,
R. VIGNOLA e F. VITALI

ENIRICERCHE S.p.A. - Monterotondo (Roma).

RIASSUNTO

La possibilità di regolare il processo biologico della trasformazione dell'ammonio riveste particolare importanza in agronomia in quanto influenza la forma e la persistenza del concime azotato nel suolo. Gli inibitori della nitrificazione sono tra gli strumenti più idonei ad intervenire su tale processo. Tra questi è stata studiata la diciandiamide.

La caratterizzazione del tipo di inibizione e del modo di azione della diciandiamide ha evidenziato che l'inibizione non è di tipo competitivo e che l'inibitore esercita una azione batteriostatica. Con colture di batteri nitrificanti la velocità di crescita risulta dimezzata alla concentrazione 25 mg/l di inibitore aggiunto al mezzo di crescita.

Il tipo di suolo influenza sensibilmente l'efficienza dell'azione inibente della diciandiamide; nei suoli esaminati una efficace inibizione è stata ottenuta con 10 ppm.

È stata verificata la possibilità di regolare il processo della nitrificazione tramite la diciandiamide per aumentare l'utilizzazione del fertilizzante azotato nella coltura di riso.

SUMMARY

The possibility of controlling the biological nitrification of ammonium is very important in crop management because it affects the ionic status and the persistence of the nitrogen fertilizers in soil. Nitrification inhibitors seem to be adequate tools for regulating this process. Many chemicals have been identified which inhibit nitrification, one of these, dicyandiamide (DCD), is the object of this paper.

Our results on the inhibitory effect and the mode of action of DCD showed a non competitive inhibition and a bacteriostatic effect. The growth rate of nitrifying bacteria in mixed culture was halved in the presence of 25 mg/l of DCD.

The DCD effectiveness, as a nitrification inhibitor, is notably different according to soil type; in tested soils an effective inhibition as achieved through the application of 10 ppm.

The possibility of controlling the nitrification process with DCD to increase the efficiency of N fertilizer use, has been tested in rice culture.

INTRODUZIONE

La nitrificazione è dal punto di vista agronomico estremamente importante perchè è il maggior mezzo naturale che assicura lo ione nitrato alla

nutrizione della pianta trasformando l'ammonio prodotto dalla mineralizzazione della sostanza organica nel suolo o aggiunto come fertilizzante minerale (SCHMIDT, 1982).

Il risultato della trasformazione è la conversione dell'azoto in una forma che può essere facilmente persa dal suolo o per dilavamento dello ione nitrico o per denitrificazione, sotto forma di azoto gassoso.

L'interesse per il controllo della nitrificazione è legato all'intenzione di ridurre o impedire queste perdite di azoto dal sistema suolo-pianta. La trasformazione di ammonio a nitrato avviene con una sequenza schematica di due stadi distinti di cui il primo, il passaggio da ammonio a nitrito avviene ad opera di alcuni generi (di cui il più studiato è *Nitrosomonas*) mentre il secondo, il passaggio da nitrito a nitrato avviene ad opera principalmente di un altro genere, *Nitrobacter*.

Dei due stadi della nitrificazione è opportuno ridurre la trasformazione di ammonio a nitrito senza alterare il passaggio da nitrito a nitrato dato che l'ammonio può essere assorbito dalla pianta e il nitrito è invece tossico. La scelta di caratterizzare il comportamento della diciandiammide come inibitore della nitrificazione nasce dall'esigenza di ottimizzarne l'uso in relazione alle necessità agronomiche. Infatti, nonostante l'efficacia della diciandiammide sia nota da molti anni e in diverse condizioni sperimentali di laboratorio (REDDY, 1964), molti punti sono ancora da chiarire nel suo comportamento agronomico. In particolare ci è sembrato opportuno approfondire il modo di azione della diciandiammide in relazione al fertilizzante azotato, all'interazione con le popolazioni batteriche nitrificanti (azione batteriostatica o battericida dell'inibitore) e ai tempi di azione. È stata, inoltre, studiata la relazione tra la durata del periodo di inibizione e le concentrazioni proponibili nella pratica agronomica, tenendo in considerazione la persistenza nel suolo della diciandiammide.

Di fondamentale importanza ci è sembrato, poi, stabilire il grado di dipendenza del comportamento agronomico della diciandiammide dalla originaria capacità nitrificante del suolo e in genere delle diverse situazioni pedoclimatiche che si potranno incontrare nell'uso (FOCHT, 1977). Si è verificato nella coltivazione del riso in serra l'effetto della diciandiammide aggiunta ad un fertilizzante azotato (urea) sulla resa e sulla produzione dei nitrati soggetti ad eventuali perdite nella somministrazione.

MATERIALI E METODI

Determinazione dell'attività nitrificante. L'attività nitrificante era determinata dalla quantità di nitrito prodotto all'ora da parte di un campione di suolo aggiunto ad una soluzione contenente ammonio a concentrazione saturante

e clorato di potassio (come inibitore della trasformazione di nitrito a nitrate) in tampone a pH 8. Il tempo di durata del saggio era sufficientemente breve (fino a sette ore) per considerare costante la concentrazione del sistema enzimatico nitrificante.

Procedura del saggio: un campione di suolo equivalente a 10-20 g di peso secco era aggiunto ad una soluzione sterile di 50-100 ml contenente $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 3,7 mM, KC10_3 6 mM, tamponata a pH 8 con 1,4 mM di fosfato di potassio. Dopo incubazione a 30°C in bagno rotante una aliquota tra 0,1-0,5 ml di sospensione era prelevata ad intervalli di tempi di 1 h circa. Dopo centrifugazione (5000 x g per 5') sul supernatante era determinata la concentrazione di N-NO_2^- secondo il metodo di Garret e Nason (1969).

Dosaggio attività nitrificante nel suolo: campioni di suolo equivalente a 100 g di peso secco, addizionati di 100 ppm di N-NH_4^+ erano incubati all'umidità equivalente 3/4 della capacità di campo a 30°C. Ad intervalli di tempo di una settimana circa campioni di 10-20 g erano prelevati e sottoposti alla determinazione dell'attività nitrificante.

Crescita delle popolazioni batteriche nitrificanti. La crescita delle popolazioni nitrificanti era determinata secondo una modificazione del metodo di Soriano e Walker (1968) e precisamente un campione acquoso di suolo equivalente a 2 g di peso secco era aggiunto a 250 ml di soluzione sterile contenente: 40 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 200 mg/l KH_2PO_4 ; 40 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 500 mg/l $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 1,2 g/l KC10_3 ; 2,4 mg/l Ferro-citrato; la soluzione era portata a pH 8 con $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 5%.

Analisi chimiche. Il suolo era addizionato di una soluzione satura di CaSO_4 (20.50 P/V) ed estratto per 15' in un bagno rotante. I campioni erano filtrati e il NO_3^- era determinato con l'elettrodo specifico Orion. La diciandiamide era determinata su un estratto di suolo (1:2 P/V) secondo il metodo di VILSMEIER (1979).

Analisi sulla pianta. L'attività della nitrate riduttasi era determinata in vitro con il metodo di HAGEMANN (1980); il contenuto in clorofilla con il metodo di WINTERMANS e DE MOTS (1965).

Suoli. Si riportano i dati delle analisi chimico-fisiche dei suoli usati nelle diverse esperienze:

— S. Lorenzo: N-tot org. 0,142%; C. org. 1,53%; N-N_4^+ 8 ppm; N-NO_3^- 4 ppm; P disp. 64 ppm; K disp. 174 ppm; argilla 15,6%; limo 20,3%; sabbia grossa 15,9%; sabbia fine 48,2%; pH (H_2O) 5,6.

— Baraggia: N-tot org. 0,079%; C org. 0,63%; N-NH_4^+ 6 ppm; N-NO_3^- 3 ppm; P disp. 24 ppm; K disp. 106 ppm; Argilla 22,7%; limo 29%; sabbia grossa 1,9%; sabbia fine 46,4%; pH (H_2O) 5,6.

— Lomellina: N-tot. org. 0,138%; C org. 1,42%; N-NH₄⁺ 8 ppm; N-NO₃⁻ 3 ppm; P disp. 78 ppm; K disp. 89 ppm; Argilla 18,5%; limo 15,3%; sabbia grossa 18,3%; sabbia fine 47,9%; pH (H₂O) 5,7.

— Invernizzi: N-tot org. 0,062%; C org. 0,57%; N-NH₄⁺ 6 ppm; N-NO₃⁻ 3 ppm; P disp. 25 ppm; K disp. 96 ppm; argilla 5,9%; limo 5,7%; sabbia grossa 40,9%; sabbia fine 48,1%; pH (H₂O) 6,3.

— Sabbioso: N-tot org. 0,03%; C org. 0,30%; N-NH₄⁺ 3 ppm; N-NH₃⁻ 3 ppm; P disp. 3 ppm; K disp. 20 ppm; argilla 9,1%; limo 8,3%; sabbia grossa 3,7%; sabbia fine 78,9%; pH (H₂O) 6,3.

— Medio: N-tot org. 0,166%; C org. 1,52%; N-NH₄⁺ 10 ppm; N-NO₃⁻ 119 ppm; P disp. 28,4 ppm; K disp. 126 ppm; argilla 15,7%; limo 14,9%; sabbia grossa 24%; sabbia fine 45,4% pH (H₂O) 4,5.

— Argilloso: N-tot org. 0,11%; C org. 0,78%; N-NH₄⁺ 4 ppm; N-NO₃⁻ 7 ppm P disp. 18,2 ppm; K disp. 543 ppm; argilla 44%; limo 21%; sabbia 29%; pH (H₂O) 6,5.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'influenza della concentrazione del substrato ammonio sull'azione della diciandiammide come inibitore della nitrificazione è importante ai fini dell'uso agronomico di questo prodotto agrochimico. In esperimenti condotti nel nostro laboratorio non si notava nessun cambio del grado di inibizione quando ad uno stesso suolo venivano aggiunte quantità diverse di ammonio e la stessa quantità di diciandiammide.

Nella fig. 1 si può notare che anche elevate quantità di substrato (fino ad oltre 100 volte il valore saturante: $K_m \text{ NH}_4^+ = 1 \text{ mg/1}$) non rimuovono o riducono l'effetto inibente della diciandiammide, che determina, quindi, la velocità della reazione indipendentemente dalla concentrazione del substrato. Questi dati sembrano indicare che la diciandiammide agisce ad un sito diverso da quello dell'ammonio e che pertanto la sua azione inibente non è competitiva con l' NH_4^+ . Successivamente la nostra attività è stata rivolta a chiarire i tempi di azione della diciandiammide, se cioè agisce direttamente a tempi brevi di qualche ora sul sistema enzimatico nitrificante o se la sua azione si esplica in tempi medi-lunghi di qualche giorno. Noi abbiamo riscontrato (fig. 2) che l'attività nitrificante è costante, anche a concentrazioni elevate di diciandiammide per tempi (6h) in cui è possibile ritenere costante il numero dei batteri (BOCK, 1978) (BELSER, 1979).

Una ulteriore conferma del risultato precedente si è avuta quando aumentando il tempo di contatto tra l'inibitore e le popolazioni batteriche nitrificanti fino a 2 giorni, nelle condizioni in cui la crescita batterica è minima

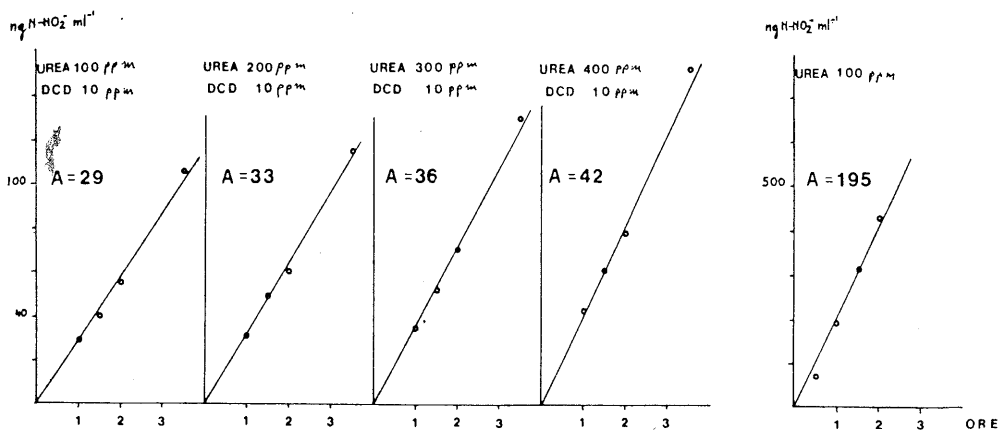


Fig. 1. — Attività nitrificante istantanea ($A = \text{ng N-NO}_2^- \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ suolo}$) di suolo officina fertilizzato con diverse quantità di UREA e la stessa quantità di diciandiamide. 100 g di suolo incubato per due settimane a $3/4$ capacità di campo a 30°C . Alla fine dell'incubazione si determina l'attività nitrificante istantanea.

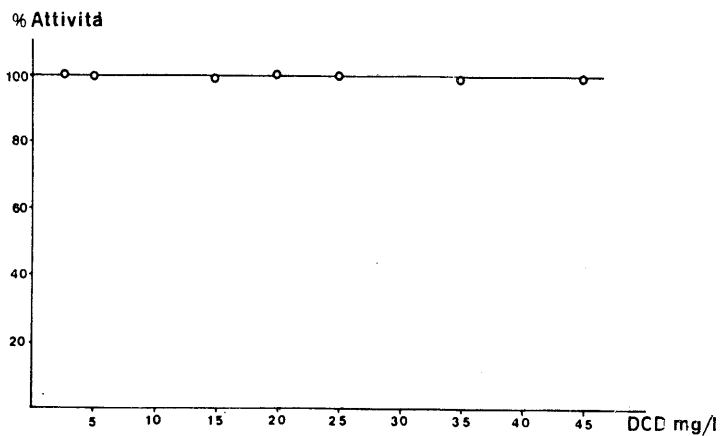


Fig. 2. — Variazione percentuale di attività nitrificante di suolo officina sottoposto a diverse concentrazioni di diciandiamide per 6 ore. 1 g di suolo officina proveniente da fase esponenziale di crescita di batteri nitrificanti (attività: $1,6 \mu\text{g N-NO}_2^- \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) è incubato con 10 ml di soluzione contenente 106 mg/l N-NH_4^+ e diciandiamide a diverse concentrazioni a 30°C sotto agitazione.

(a 5°C è di circa il 5% in 2 giorni secondo RODGERS (RODGERS, 1982) non si riscontrava alcuna variazione di attività nitrificante.

L'evidenza di queste prove ci ha spinto a postulare che l'azione della diciandiammide potesse espletarsi più sul sistema di crescita dei batteri nitrificanti che direttamente sul complesso enzimatico propriamente responsabile dell'ossidazione dell'ammonio. Tale ipotesi trova conferma nell'esperienza successiva; nelle fig. 3 è mostrata la variazione di attività nitrificante a diverse concentrazioni di diciandiammide a vari tempi; l'effetto inibente è minimo a tempi relativamente brevi (2 giorni) e rilevante dopo 4 giorni nelle condizioni

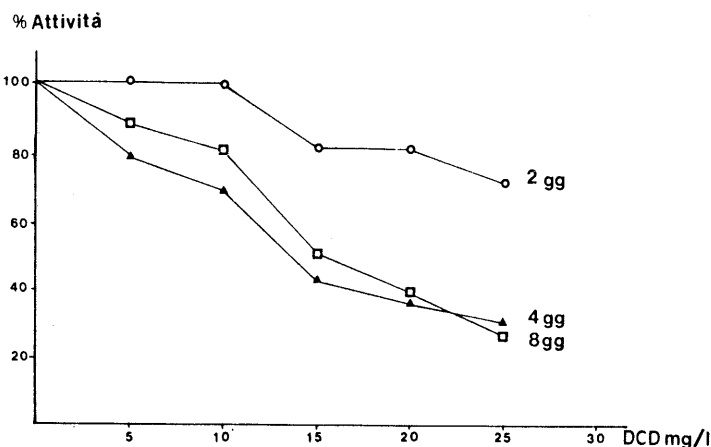


Fig. 3. — Variazione percentuale dell'attività nitrificante di suolo officina sottoposto a diverse concentrazioni di diciandiammide per tempi diversi. Ad intervalli di tempo si procede al dosaggio dell'attività.

del saggio, indicando che l'effetto della diciandiammide si manifesta non immediatamente, ma nel tempo.

L'intervento della diciandiammide sulla velocità di crescita delle popolazioni batteriche nitrificanti del suolo è ancora più chiaro nella fig. 4 dove sono riportate le curve di crescita a diverse concentrazioni di inibitore.

La possibilità di usare la diciandiammide in agricoltura è direttamente collegata alla durata del periodo di inibizione della nitrificazione che dipende dalla persistenza e trasformazione nel suolo dell'inibitore. Prove di persistenza effettuate nel nostro laboratorio hanno evidenziato differenze notevoli tra i tempi di degradazione della diciandiammide in terreni di diversa origine.

Un confronto tra tre terreni di diversa granulometria è illustrato nella fig. 5 dove è stata seguita nel tempo la scomparsa della diciandiammide mesco-

lata con un terreno mantenuto a temperatura e umidità costanti. Se i dati di fig. 5 si inseriscono in un modello cinetico di primo ordine si ottengono i coefficienti di tab. 1 in cui si vede che i tempi di dimezzamento anche se dipendenti dal terreno sono sufficienti, alla concentrazione del saggio, ad assicurare una persistenza di tre o più settimane.

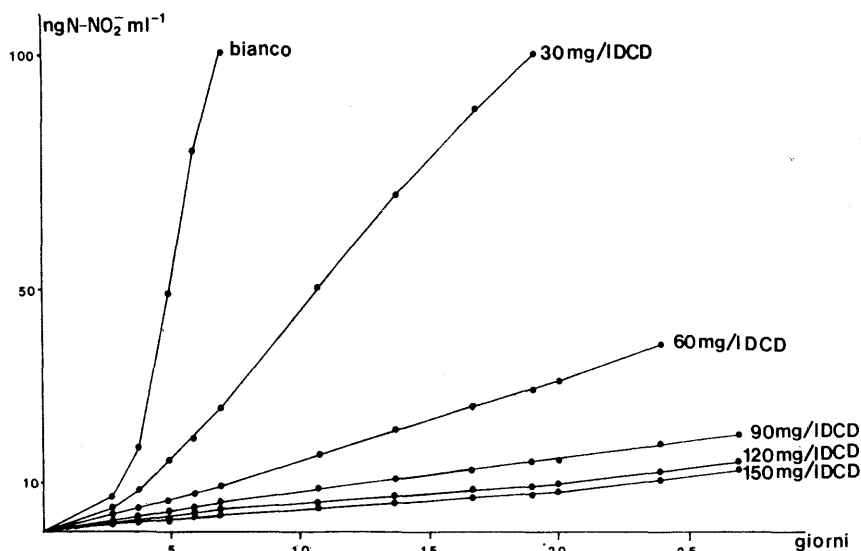


Fig. 4. — Curve di crescita di popolazioni batteriche nitrificanti di suolo officina sottoposto a diverse concentrazioni di diciandiamide.

Nelle fig. 6, 7, 8 si è verificata l'influenza, sulla persistenza della diciandiamide, della variazione di pH prodotta su terreni ammendati con carbonato di calcio in tre terreni diversi. Per i due terreni S. Lorenzo e Baraggia l'ammendamento produce un rallentamento della degradazione e ciò è consistente con l'accettata sequenza idrolitica che comporta nel primo passaggio di degradazione della diciandiamide l'addizione di una molecola d'acqua (RATHSACK, 1978). Per il suolo Lomellina al contrario la degradazione è risultata più veloce con il suolo ammendato. È possibile che la diversità di comportamento dei tre suoli sia da attribuire alla presenza di fattori di origine biologica, visto che l'aumento di pH prodotto dall'ammendamento di un suolo, può dare luogo ad un aumento di attività microbica (SARATHCHANDRA 1981). Infatti una prova condotta sullo stesso suolo Lomellina sterilizzato ha dato i risultati di fig. 9. Il confronto con il caso di terreno non sterilizzato di fig. 8 evi-

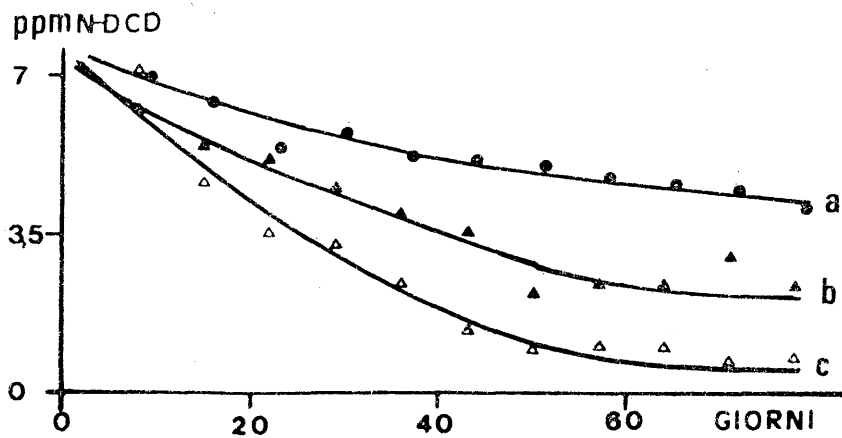


Fig. 5. — Degradazione della dicianidamide in tre suoli di diversa granulometria. a: sabbioso, b: medio impasto, c: argilloso.
Temperatura: 20°C, umidità: 3/4 C.d.C..

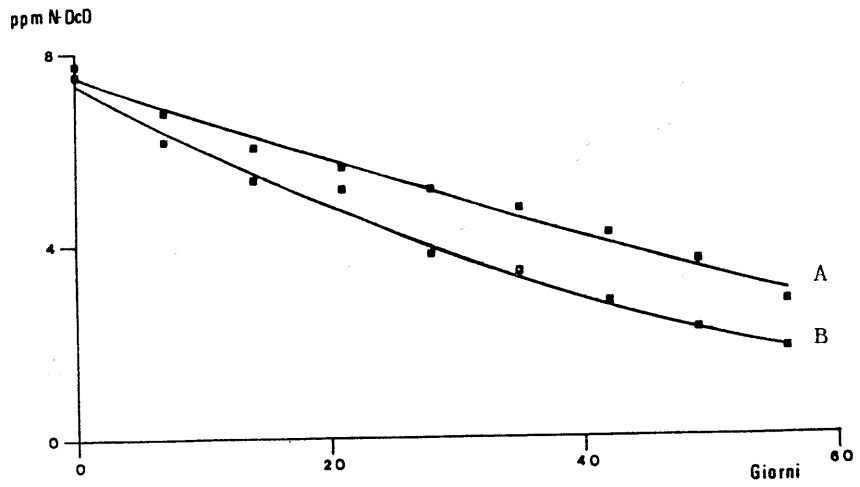
denza sostanziali differenze prodotte dalla sterilizzazione, in particolare una idrolisi molto più lenta e soprattutto la scomparsa di differenze significative tra suolo naturale e quello ammendato.

Di fondamentale importanza, ci è sembrato poi, stabilire il grado di dipendenza del comportamento della dicianidamide dalla originaria capacità nitrificante del suolo ed in genere dalle diverse situazioni pedoclimatiche che si potranno incontrare nell'uso agronomico.

La fig. 10 mostra l'ampia variabilità dell'attività nitrificante in alcuni suoli diversi per granulometria e pH ed indica chiaramente la diversità di situazioni biologiche in cui l'azione dell'inibitore dovrà esplicarsi. Dai risultati delle prove su questi terreni è stato possibile confermare (VILSMEIR, 1960) che la dicianidamide alle dosi pari a 10 ppm riduce drasticamente la concentrazione di nitrato rispetto al caso del suolo non trattato con l'inibitore. Differenze di comportamento si manifestano usando concentrazioni di inibitore più basse;

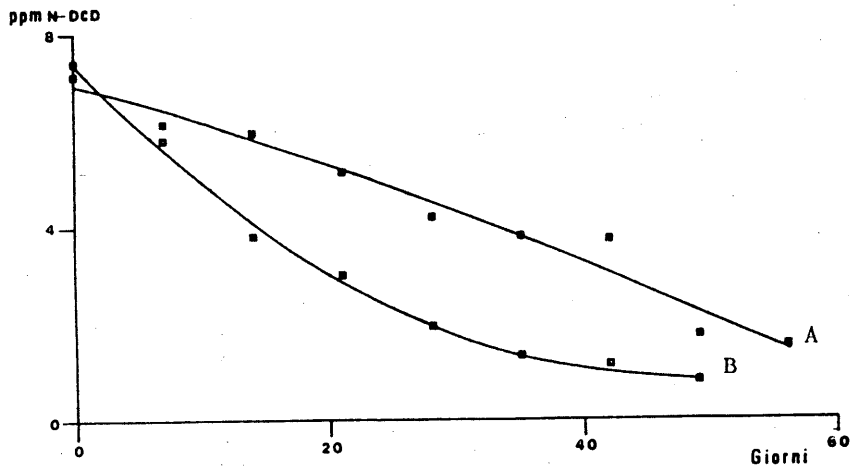
Tab. 1. — Coefficienti di velocità di degradazione della dicianidamide calcolati dai dati di Fig. 5.

Suolo	Coeff. di velocità (gg^{-1})	Tempo di dimezzamento (gg)
Sabbioso	$1,0 \times 10^{-2}$	69
Medio impasto	$1,8 \times 10^{-2}$	39
Argilloso	$3,2 \times 10^{-2}$	22



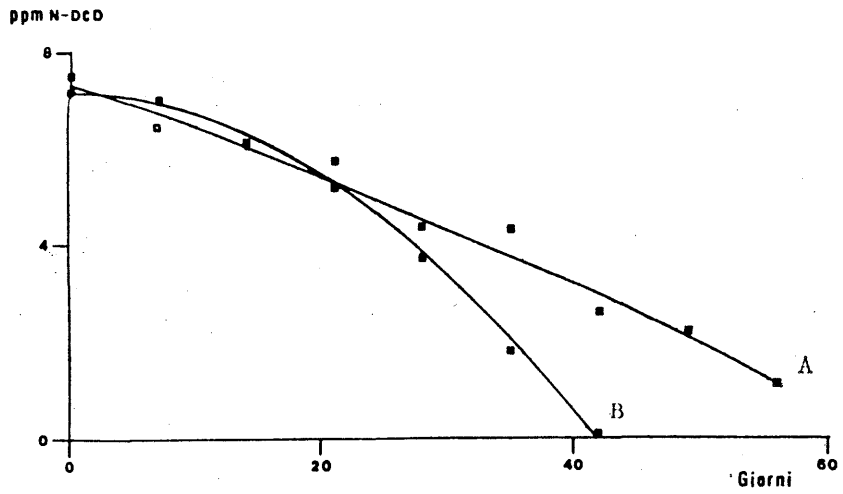
Suolo "Barraggia" A con amm. B senza amm.

Fig. 6. — Decadimento della diciandiammide su terreno Baraggia.



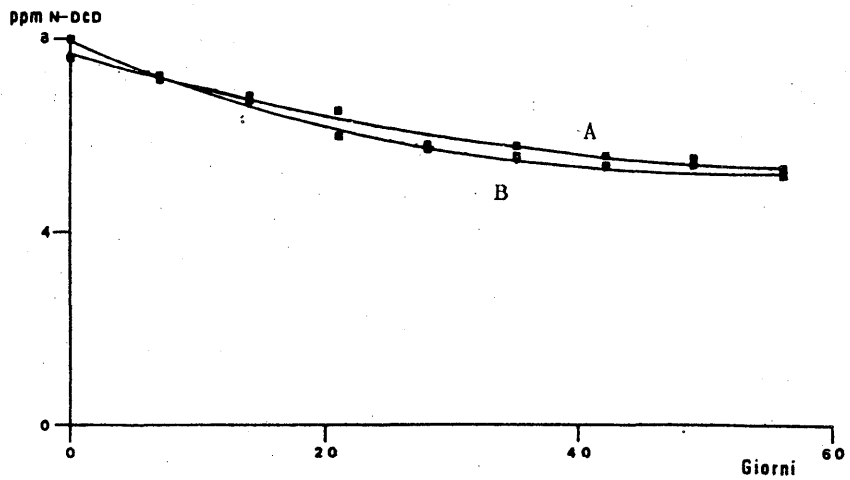
Suolo "S. Lorenzo" A con amm. B senza amm.

Fig. 7. — Decadimento della diciandiammide su terreno S. Lorenzo.



Suolo "Lomellina" A con amm. B senza amm.

Fig. 8. — Decadimento della diciandiamide su terreno Lomellina.



Suolo sterilizzato "Lomellina" A con amm. B. senza amm.

Fig. 9. — Decadimento della diciandiamide su terreno Lomellina sterilizzato.

in questo caso infatti i diversi terreni si differenziano nella durata del periodo di inibizione e nel grado di attività nitrificante residua. Nelle fig. 11, 12, 13 è mostrata la diversa efficacia dell'inibitore, alle concentrazioni usate, nei diversi terreni confermando l'importanza rivestita dalla natura del terreno nella definizione dell'azione dell'inibitore.

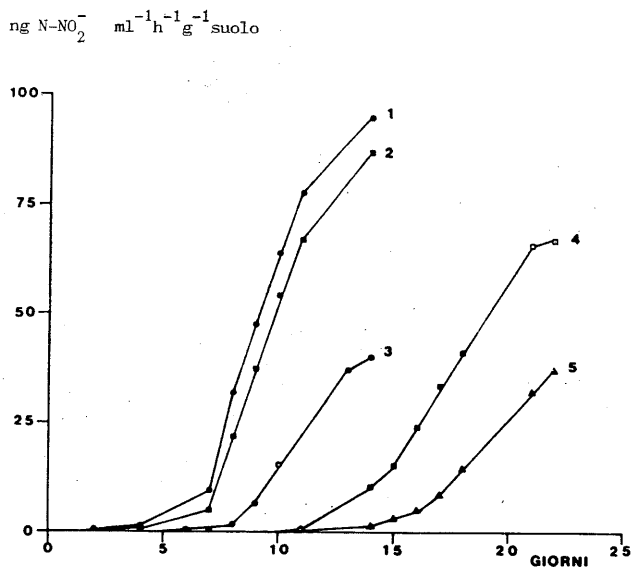


Fig. 10. — Attività nitrificante di suoli diversi. La numerazione corrisponde ai vari tipi di terreno.

1: Ferrara, 2: Officina, 3: S. Lorenzo, 4: Sabbioso, 5: Soriano.

È stato, inoltre, verificato l'effetto della diciandiamide sulla coltivazione del riso condotta in serra su terreni tipici delle zone risicole italiane.

I cambiamenti dell'attività nitrificante (tab. 2, 3, 4) sono risultati collegati alle varie fasi colturali (aggiunta del fertilizzante in pre-trapianto, sommersione, aggiunta del fertilizzante in copertura, etc).

L'effetto della diciandiamide quale inibitore della nitrificazione è evidente soprattutto nel periodo di pre-trapianto in tutti e tre i suoli, anche se negli stessi suoli l'attività nitrificante è nettamente diversa.

La resa in granella è risultata maggiore quando il suolo è stato fertilizzato con urea + diciandiamide rispetto a quello fertilizzato con solo urea (fig. 14). Differenze significative di resa si sono, inoltre, evidenziate tra i terreni usati nella coltura (fig. 15).

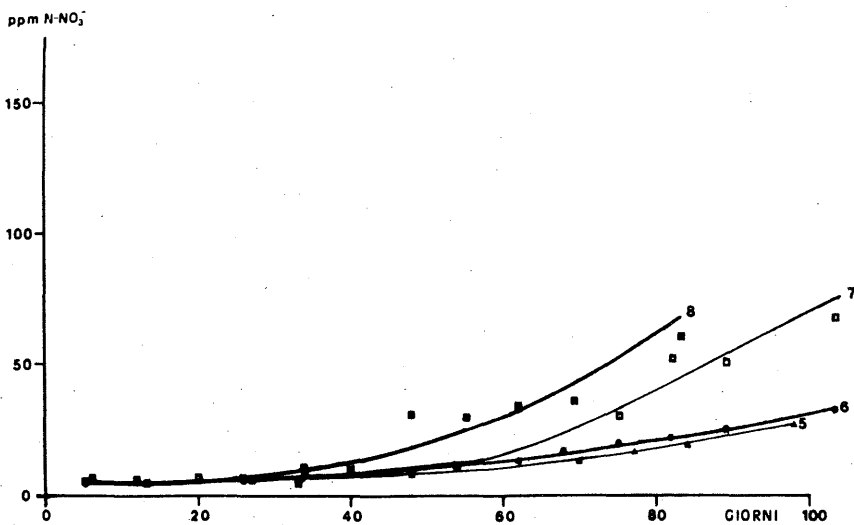


Fig. 11. — Nitrificazione di urea + 5% DCD.
Terreni: 5 = S. Lorenzo, 6 = Baraggia, 7 = Lomellina, 8 = Invernizzi.

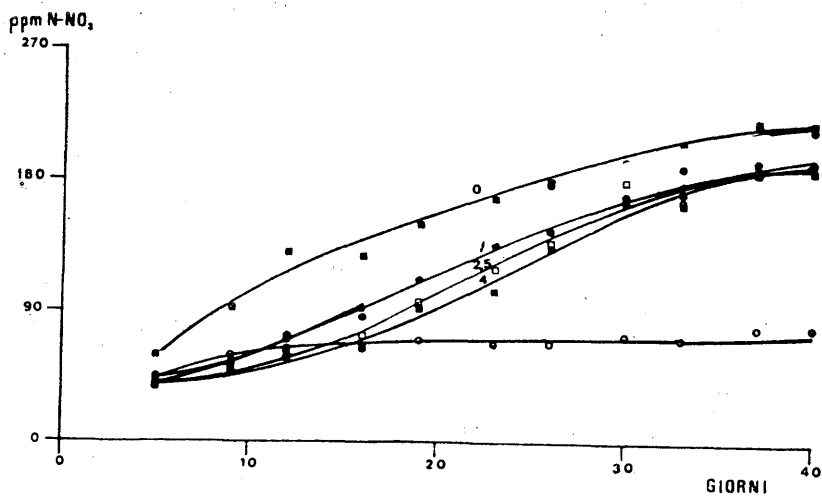


Fig. 12. — Suolo S. Lorenzo. Nitrificazione di 200 ppm di urea mescolata con 0, 1, 2.5 e 4 ppm di DCD.

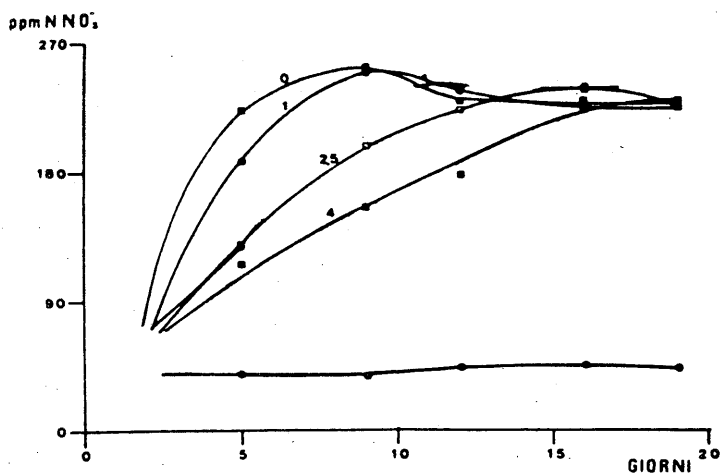


Fig. 13. — Suolo officina. Nitrificazione di 200 ppm di urea mescolata con 0, 1, 2.5 e 4 ppm di DCD.

Alle dosi utilizzate l'aggiunta di diciandiammide non ha prodotto variazioni significative dei principali indici fisiologici del metabolismo dell'azoto nel riso. Il contenuto in clorofilla e l'attività della nitrato riduttasi sono leggermente maggiori nelle piante trattate con urea + diciandiammide rispetto a quelle trattate con solo urea (fig. 16, 17); queste variazioni si riscontrano anche nelle rese finali.

Tab. 2. — Attività nitrificante nel suolo S. Lorenzo a vari tempi e fasi culturali.

Trattamenti (ppm)	Nitrito formato ng N-NO ₂ ml ⁻¹ h ⁻¹ 10 g ⁻¹ suolo							Raccolto
	Inizio incubazione	Fine incubazione	10 gg dopo sommerzione	Fine sommerzione	2 gg dopo asciutta	10 gg dopo 2 ^a sommerzione	60 gg dopo 2 ^a sommerzione	
N-Urea 115	10	137	69	49	52	37	28	4
N-Urea 114,1 N-DCD 1,1	10	12	25	8	9	8	7	6
N-Urea 111,6 N-DCD 3,5	11	8	17	5	7	9	5	6
N-Urea 109,6 N-DCD 5,7	7	10	13	8	7	5	6	4
N-CaCy 115,3	13	9	15	5	7	5	4	3
N-Urea / N-DCD /	8	53	34	28	23	21	18	3

Tab. 3. — Attività nitrificante nel suolo Baraggia a vari tempi e fasi colturali.

Trattamenti (ppm)	Nitrito formato ng N-NO ₂ ml ⁻¹ h ⁻¹ 10 g ⁻¹ suolo							Raccolto
	Inizio incubazione	Fine incubazione	10 gg dopo sommerzione	Fine sommerzione	2 gg dopo asciutta	10 gg dopo 2 ^a sommerzione	60 gg dopo 2 ^a sommerzione	
N-Urea 115	12	80	71	48	36	29	17	5
N-Urea 114,1 N-DCD 1,1	8	13	21	5	6	5	7	2
N-Urea 111,6 N-DCD 3,5	5	3	20	8	4	5	6	2
N-Urea 109,6 N-DCD 5,7	5	3	13	5	5	6	3	3
N-CaCy 115,3	5	2	8	3	5	5	5	2
N-Urea / N-DCD /	8	32	33	28	22	18	9	6

Tab. 4. — Attività nitrificante nel suolo Invernizzi a vari tempi e fasi colturali.

Trattamenti (ppm)	Nitrito formato ng N-NO ₂ ml ⁻¹ h ⁻¹ 10 g ⁻¹ suolo							Raccolto
	Inizio incubazione	Fine incubazione	10 gg dopo sommerzione	Fine sommerzione	2 gg dopo asciutta	10 gg dopo 2 ^a sommerzione	60 gg dopo 2 ^a sommerzione	
N-Urea 115	5	29	17	12	6	10	6	5
N-Urea 114,1 N-DCD 1,1	4	4	5	3	5	4	5	3
N-Urea 111,6 N-DCD 3,5	4	3	5	4	5	4	5	3
N-Urea 109,6 N-DCD 5,7	3	3	7	3	4	4	4	3
N-CaCy 115,3	4	3	5	6	3	4	3	3
N-Urea / N-DCD /	3	25	11	8	8	6	4	3

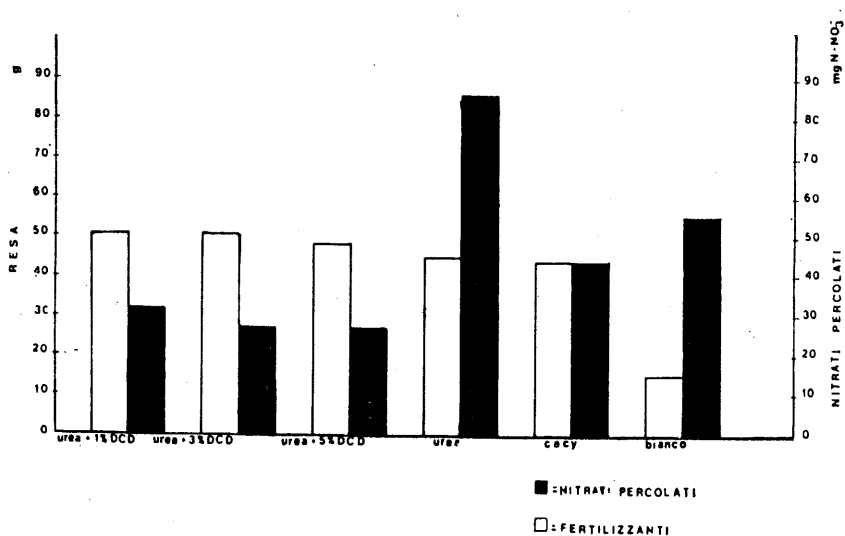


Fig. 14. — Resa in granella di riso e percolamento nitrati in funzione di diversi trattamenti fertilizzanti.

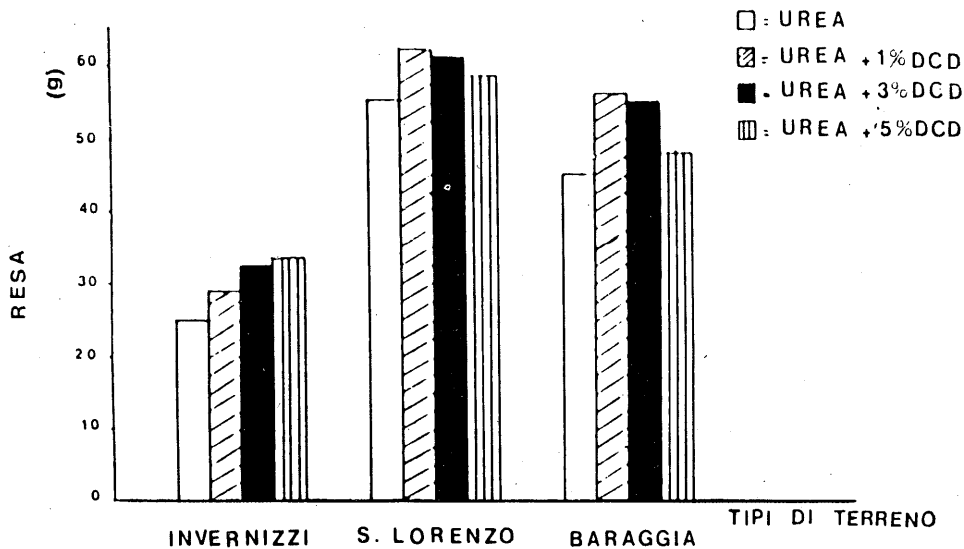


Fig. 15. — Resa in granella di riso in funzione del tipo di fertilizzante e dei tipi di terreno.

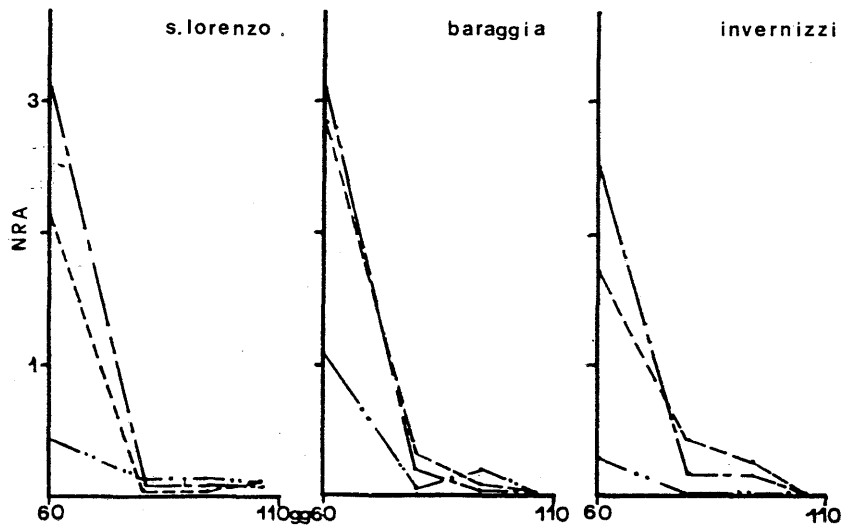


Fig. 16. — Attività della nitrato reductasi (espressa in $\mu\text{mol NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{f.w. h}^{-1}$) in piante fertilizzate con urea ----, urea + DCD - · - · e non fertilizzate · · · sui diversi suoli.

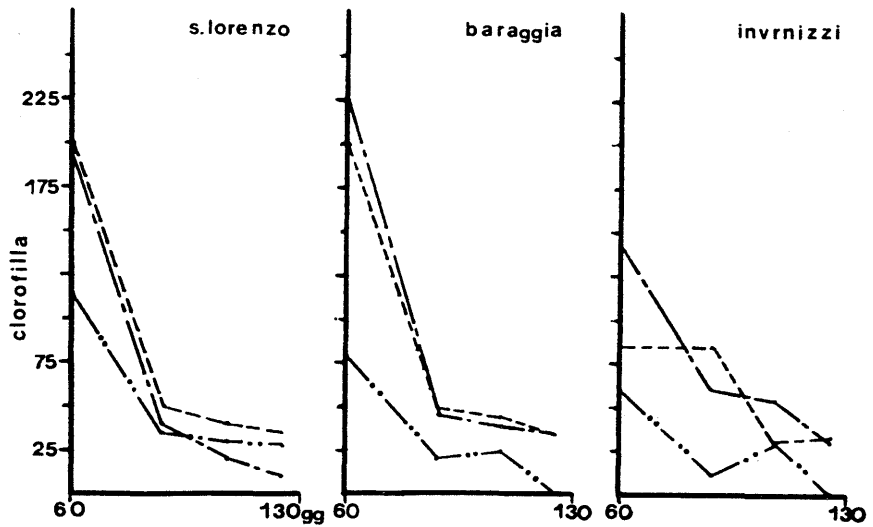


Fig. 17. — Contenuto in clorofilla (espresso in $\mu\text{g g}^{-1} \text{f.w.}$ di piante fertilizzate con urea ----, urea + DCD - · - · e non fertilizzate · · · sui diversi suoli.

CONCLUSIONI

Le nostre prove hanno evidenziato che l'inibizione della nitrificazione da parte della diciandiammide può essere un approccio valido ed efficace per ridurre le perdite di azoto dal suolo per percolamento o per denitrificazione.

L'inibizione della diciandiammide si esplica diminuendo la velocità di crescita delle popolazioni batteriche nitrificanti. L'inibizione infatti non è immediata ma si evidenzia dopo un certo tempo, breve ma significativo; ed è proprio la velocità di crescita microbica che manifesta la forte dipendenza dalla concentrazione dell'inibitore.

Ne consegue che la concentrazione significativa è quella rispetto al suolo e non quella usualmente indicata in riferimento al fertilizzante azotato, non risultando l'inibitore affatto competitivo con il substrato. La degradazione della diciandiammide nel suolo avviene lentamente così che in genere l'inibitore permane per tempi sufficientemente lunghi rispetto alle necessità agronomiche, ma la effettiva persistenza dipende oltre che dalle condizioni di temperatura e potenziale idrico, dal tipo di suolo e può essere influenzata dalle pratiche colturali come per esempio l'ammendamento con carbonato di calcio. Come diversa da suolo a suolo è l'attività nitrificante, così l'efficacia della diciandiammide, specie a basse concentrazioni, dipende dal suolo, anche se, a concentrazioni abbastanza alte di inibitore, la nitrificazione è sempre inibita.

Una applicazione della diciandiammide è stata effettuata con la coltivazione del riso. Con questa coltura si è verificato in serra che l'aggiunta di diciandiammide al fertilizzante azotato produce un aumento in resa ed una diminuzione dei nitrati persi nella sommersione. Tuttavia ulteriori prove in pieno campo sono necessarie per determinare le concentrazioni ottimali da usare nella prassi agronomica per assicurare una efficace inibizione della nitrificazione in relazione alle diverse situazioni pedoclimatiche e alle esigenze delle colture.

Ringraziamenti

Si ringrazia l'ANIC-Agricoltura per il supporto dato alla realizzazione di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- BELSER L.W., 1979 — *Population ecology of nitrifying bacteria*. Am. Rev. Microbiol. 33: 309.
BOCK E., 1978 — *Lithoautrophic and chemoautrophic growth of nitrifying bacteria*.

- p. 310-314 in D. SCHLESSINGER (ed) Microbiology 1978. Am. Soc. Microbial Washington D.C.»
- FOCHT D.D. and VERSTRAETE W., 1977 — *Biochemical Ecology of nitrification and denitrification*. Adv. Microbial. Ecol. 1, 135.
- GARRETT R.H. and NASON A., 1969 — *Further purification and properties of Neurospora Nitrate Reductase*. J. Biol. Chem. 244, 2870.
- HAGEMAN R.H. and REED A.J., 1980 — *Nitrate reductase from higher plants*. Methods in Enzym. 69, 270.
- RATHSACK K., 1978 — *Die Nitrifizierende Wirkung des Dicyandiamids*. Landwirtsch. Forsch. 31, 347.
- REDDY G.R., 1964 — *Effect of mixing varying quantities of dicyandiamide with ammonium fertilizers on nitrification of ammonia in soils*. Can. J. Soil Sci. 44, 254.
- RODGERS G.A. and ASHWORTH J. 1982 — *Bacteriostatic action of nitrification inhibitors*. Can J. Microbial. 28, 1093.
- SARATHCHANDRA S.U. and UPSDELL M.P., 1981 — *Nitrogen mineralization and the activity and population of microflora in a high producing yellow-brownloam under pasture*. N.Z. Journal of agricultural research 24: 171-176.
- SORIANO S. and WALKER N., 1968 — *Isolation of ammonia oxidizing autotrophic bacteria*. J. Appl. Bacteriol. 31, 493.
- SCHMIDT E.L., 1982 — *Nitrification in soil* in F.J. STEVENSON (ed.) *Nitrogen in agricultural soils*. p. 253-288. Am. Soc. of Agronomy, Madison, Wisconsin U.S.A.
- VILSMEIER K., 1979 — *Kolorimetrische Bestimmung von Dicyandiamid in Boden*. Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd. 142, 792.
- VILSMEIER K. and AMBERGER A., 1960 — *The inhibition of nitrification by dicyandiamide in model and pot experiments*. Landwirtsch. Forsch. 13, 134.
- WINTERMANS J.F.G.M. and DE MOTS A., 1965 — *Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol*. Biochim. Biophys. Acta. 109, 448.

METODI DI BATTERIZZAZIONE CON **AZOSPIRILLUM** SPP. DI COLTURE CEREALICOLE

F. FAVILLI, W. BALLONI, A. MESSINI

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica - Università
e Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - C.N.R. - Firenze

RIASSUNTO

Vengono esaminati i punti essenziali nella tecnologia di batterizzazione con *Azospirillum* spp. di colture cerealicole.

I criteri, che assicurano risultati positivi nella pratica di batterizzazione con *Asporillum* sono basati:

- a) sulla selezione di adatti ceppi di *Azospirillum*;
- b) sulla scelta di un adatto supporto capace di mantenere a lungo vitale ed efficace la biomassa microbica;
- c) su un efficace metodo di inoculazione delle sementi.

Dopo aver illustrato i vari sistemi di preparazione e di impiego di questi inoculanti, vengono riportati i risultati più significativi della batterizzazione con *Azospirillum* di colture cerealicole, conseguiti, negli ultimi cinque anni in diverse nazioni, Italia compresa.

SUMMARY

The main points on the technology of *Azospirillum* bacterization of cereals are examined.

The most consistent positive results on the *Azospirillum* bacterization practice can be obtained using selected *Azospirillum* strains, suitable carriers able to maintain high inoculum survival and efficient seeds inoculation methods.

After showing the different methods to prepare and use these inoculants, the most significant results of *Azospirillum* bacterization of cereal seeds in field experiments obtained, during the last five years, in many countries, Italy included, are reported.

Le ricerche sull'ecologia dell'azotofissazione rizosferica hanno ormai mostrato con grande evidenza che le radici di molte piante erbacee ed arbustive sono sede di attività azotofissatrice talvolta assai intensa (1) dovuta all'associazione parasimbiotica con batteri azotofissatori liberi.

La maggior parte di queste associazioni segnalate inizialmente su piante tropicali (2, 3, 4) e successivamente in ambiente temperato (5, 6, 7) sembrano capaci di sopperire all'intero fabbisogno azotato della pianta (8).

L'interesse suscitato dal reperimento sull'apparato radicale di graminacee di batteri azotofissatori del genere *Azospirillum* viventi in associazione non simbiotica e dotati di una intensa attività azotofissatrice (4) aprì la via alla possibilità di sfruttamento agronomico di queste associazioni radicali (9).

Negli anni successivi le ricerche si estesero in tutto il mondo sia per la dimostrazione che questi batteri si trovano associati alle radici di cereali di grande coltura (grano, riso, mais) e di varie foraggere (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) sia perchè la possibilità di estendere a queste piante la fissazione biologica dell'azoto rappresenta un risparmio di concimi azotati.

Da ciò il grande interesse nei progressi delle conoscenze delle proprietà di questi batteri ai fini dell'azotofissazione cosiddetta associativa, nella quale non si instaura un rapporto simbiotico vero e proprio, ma una interazione complessa batteri-sistema radicale interdipendente più o meno stretta.

I batteri del genere Azospirillum

I batteri di questo genere furono isolati per la prima volta da un terreno olandese e descritti da BEIJERINCK (20) che li denominò inizialmente *Azotobacter spirillum* e successivamente (21) *Spirillum lipoferum*.

Nuovi isolamenti di questo batterio furono realizzati da SCHRÖDER (22) da alcuni terreni della Germania.

Sia BEIJERINCK che SCHRÖDER non riuscirono però a dimostrare completamente la capacità azotofissatrice di questi batteri in coltura pura.

Nel 1949 DERX (23) isolò alcuni ceppi di *Spirillum lipoferum* da suoli e da alghe marine secche di Giava e Indonesia.

BECKING (24-25) reisolò questo organismo da terreni olandesi, da terreni tropicali dell'Indonesia e dalla fillosfera di alcune piante tropicali a foglia larga, quali *Ficus* e *Theobroma* e ne dimostrò inequivocabilmente la capacità azotofissatrice in colture pure ricorrendo all'uso dell' N^{15} .

Nel 1978 il gruppo degli spirilli azotofissatori e gram negativi chiamato originariamente *Spirillum lipoferum* da BEIJERINCK fu riclassificato da TARRAND e al. (26) nel nuovo genere *Azospirillum* comprendente due specie (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) differenti per proprietà fisiologiche e DNA omologia.

A queste due specie si è aggiunta una terza specie chiamata *Azospirillum amazonense* dal nome della regione del suo primo isolamento descritta da MAGALHAES ed al. (27).

Nella Tab. 1 vengono riportate le principali differenze tra le specie di *Azospirillum*.

Gli azospirilli, ritenuti prevalentemente batteri tropicali, sono caratterizzati in realtà da una notevole distribuzione anche nelle regioni temperate.

Tabella 1. — Caratteri differenziali tra le specie di *Azospirillum* (28).

	<i>A. amazonense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>
Crescita su mezzo con pH 6,8	debole	buono	buono
Tipo di colonie su agar patate	bianche, piatte a margini rialzati	rosa rialzate	rosa rialzate
Tolleranza a O ₂ per l'attività N ₂ fissatrice	molto bassa	bassa	bassa
Dissimilazione di NO ₃ , NO ₂	± (a)	+	+
NO ₂ a N ₂ O	—	±	±
Diametro cellule (nm in N ₂ fix)	0,70	1,0-1,5	0,9
Flagello polare	+	+	+
Flagello laterale in agar nutritivo	—	+	+
Polimorfismo in mezzi alcalini	—	+	—
Richiesta biotina	—	+	—
Utilizzazione saccarosio	+	—	—
Tempo di generazione N ₂ fix a p O ₂ ottimale	10 h	5-6 h	6 h
% G + C (DNA)	67-68	69-70	69-70

Simboli (a) + positivo in più del 90% dei ceppi saggiati.
 + positivo in meno del 50% dei ceppi saggiati.
 — negativo

Per quanto riguarda il nostro Paese, dopo la prima segnalazione di *Azospirillum* nella fillosfera di *Tillandsia* ulteriori ricerche hanno dimostrato la presenza e la diffusione nei terreni italiani di questi batteri associati non solo alle radici di graminacee, ma anche a quelle di tabacco e fico d'india, sia nelle regioni settentrionali e centrali che in quelle del mezzogiorno (19).

La più frequente segnalazione di spp. di *Azospirillum* nei paesi tropicali, la loro relativamente più facile evidenza dipendono in certa misura dai livelli molto più bassi di azoto assimilabile presente in quei suoli rispetto ai sistemi agricoli avanzati a grande input di concimi azotati.

È significativa al riguardo l'abbondanza di azospirilli sulle radici di tabacco, la cui coltura viene generalmente praticata senza apporto di concimi azotati per evitare l'influenza negativa sulla qualità delle foglie destinate alla produzione di sigarette (18).

I riferimenti bibliografici su questo piccolo gruppo di batteri sono così

ampi che non è possibile trattare le loro caratteristiche fisiologiche e biochimiche. Ci limiteremo a illustrare i potenziali benefici economici derivanti dall'applicazione dell'associazione batterica alle colture cerealicole notoriamente esigenti di fertilizzanti azotati.

L'inoculazione con Azospirillum

Un efficiente sfruttamento agronomico dell'associazione radicale non simbiotica, cereali-*Azospirillum*, può essere realizzata solo ricorrendo alla inoculazione delle sementi con la biomassa microbica.

Occorre però premettere che i pareri sulla reale efficacia di questa pratica non sono concordi e varie sono le posizioni degli autori che si sono occupati del problema.

KLUCAS e DÖBEREINER (29) ritengono l'inoculazione con *Azospirillum* ancora suscettibile di sviluppo, mentre VLASSAK e REYNDERS (30) affermano che questa pratica rappresenta un importante mezzo per incrementare le rese dei prodotti agricoli anche in una agricoltura ove la concimazione con azoto minerale non rappresenta uno dei problemi principali.

In una rassegna sulle prove di inoculazione con *Azospirillum*, compresi gli esperimenti pionieri condotti in Florida, BODDEY e DÖBEREINER (31) ritengono che nonostante gli effetti della inoculazione siano stati estremamente variabili, da molto favorevoli per quanto riguarda la resa in prodotto ed in sostanza secca, a negativi o indifferenti, non sia possibile trarre ancora una conclusione generale circa la reale efficacia della inoculazione con *Azospirillum* e sulle cause che portano ad agire sulla resa del prodotto.

Particolari importanti emergono dai risultati ottenuti in Israele (32, 33, 34). Gli autori rilevano l'importanza delle alte temperature e della intensità luminosa sul responso alle prove di inoculazione e sul fatto che i migliori risultati sono stati ottenuti in condizioni di disponibilità iniziali di azoto per lo stadio giovanile della pianta.

Non sembra comunque prematuro affermare che l'inoculazione dei cereali con *Azospirillum* per la facilità di colonizzazione ed infezione dell'apparato radicale, per l'elevata attività azotofissatrice e la capacità del batterio associato a produrre sostanze promotrici la crescita vegetale (PGS), si traduce in ultima analisi in una maggiore resa del prodotto ed in un contemporaneo risparmio (30-50%) nell'uso dei fertilizzanti azotati (35-36).

L'importanza di questa pratica risiede nella possibilità di conciliare l'azotofissazione biologica con la parziale sostituzione dei concimi azotati minerali.

Questo risultato assume maggiore rilievo se si considera che le concimazioni azotate come sono praticate oggi, si accompagnano in talune condizioni

operative, peraltro ben individuate, a perdite sotto forma di nitrati ed ossidi di azoto con possibilità di inquinamento delle acque e dell'atmosfera, di danno biologico in quanto l'azoto minerale reprime la sintesi della nitrogenasi nei batteri presenti nel suolo e nella rizosfera e di danno economico per la perdita di fertilizzanti.

Risultati positivi nella pratica di batterizzazione con *Azospirillum* sono conseguibili affrontando il problema con criteri basati:

- 1) sulla selezione di ceppi adatti e ben caratterizzati per quanto riguarda capacità infettiva, efficienza biochimica e specificità verso la pianta ospite;
- 2) sulla selezione di adatte specie vegetali, cultivar ed ecotipi, compatibili con gli azospirilli e capaci di assicurare caratteristiche endorizosferiche ottimali (bassa pO_2 e pH neutro);
- 3) su condizioni ambientali ottimali come temperature, insolazione, terreni umidi e neutri, adeguate concimazioni azotate iniziali.

Come per altri inoculanti anche per gli azospirilli i requisiti fondamentali richiesti per consentire una valida inoculazione possono schematicamente riassumersi in:

- a) rapidità di insediamento e di colonizzazione dell'apparato radicale;
- b) elevata attività azotofissatrice;
- c) resistenza agli stress ambientali;
- d) produzione di fitormoni e sostanze promotrici la crescita (PGS).

La capacità degli azospirilli a colonizzare rapidamente la radice risiede probabilmente nella risposta chemiotattica agli aminoacidi, zuccheri ed acidi organici emessi dalle radici, sulle quali gli azospirilli tendono a formare aggregati cellulari (Fig. 1). Sulle radici i batteri si ritrovano inclusi nello strato di mucigel e presenti anche negli spazi intercellulari delle cellule del cortex, endoderma, xilema e steli (37). Oltre alla capacità di resistenza agli stress ambientali, shock termici ed idrici mediante la produzione di cisti (38), particolarmente importante è la streptomicina-resistenza che mette in grado gli azospirilli di competere con gli attinomiceti del suolo (39). L'efficacia dell'inoculante batterico è determinata dalla sua qualità e dal numero degli organismi viventi e dalla loro abilità a moltiplicarsi una volta applicati ai semi, radici e suolo.

La selezione dei ceppi con più alta attività nitrogenasica ed efficienza azotofissatrice, come proposta da SCHUBERT e EVANS (40), e l'ottenimento di ceppi mutanti capaci sia di conservare la capacità azotofissatrice anche in presenza di apprezzabili quantità di azoto combinato, sia di produrre PGS in quantità superiore a quella normalmente prodotta (41) rappresentano importanti traguardi capaci di influire sul successo dell'inoculazione con *Azospirillum*.

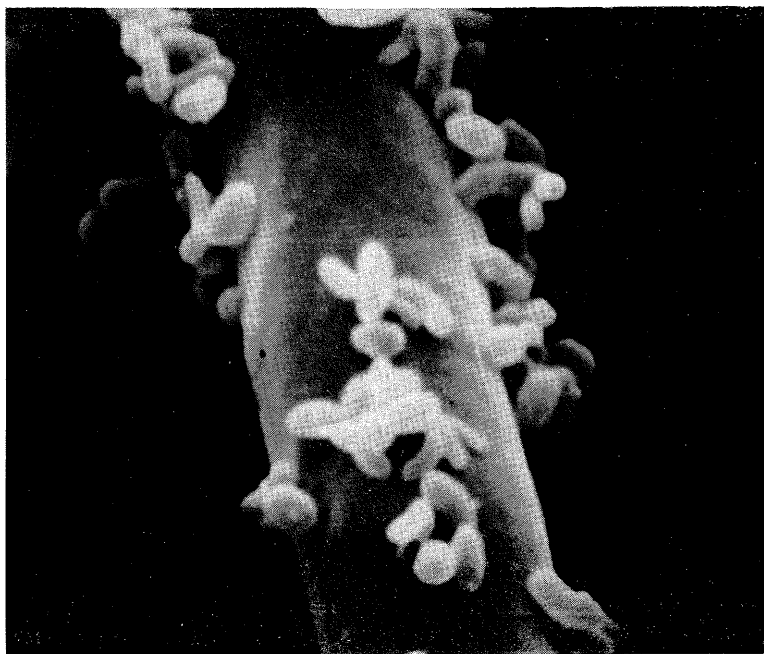


Fig. 1. — Radice di grano colonizzata da cellule di *Azospirillum* (x 5000).

Tecnologia dell'inoculazione con Azospirillum

L'esperienze di inoculazione con *Azospirillum* di cereali e foraggiere condotte ormai da otto anni con risultati, sia pure controversi, hanno permesso di sviluppare una idonea tecnologia di preparazione ed impiego di questi inoculanti.

Essa prevede le seguenti fasi:

- 1) produzione di biomassa microbica;
- 2) scelta di un adatto supporto;
- 3) modalità di inoculazione delle sementi o del suolo.

Grandi quantità di biomassa batterica possono essere ottenute in laboratorio su mezzo di coltura sintetico NFB (4) supplementato con acido malico e $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (1 g. l^{-1}) ed in condizioni di grande aereazione (42). Le rese in sostanza secca possono raggiungere $2-2,5 \text{ g. l}^{-1}$ pari ad una concentrazione cellulare superiore a $1,5 \times 10^9 \text{ cellule} \cdot \text{ml}^{-1}$. Rese analoghe possono essere altresì ottenute su mezzi di coltura alternativi a base di mele o borlande della

distilleria di questi frutti realizzando un notevole risparmio nelle costose fonti di carbonio (43), requisito necessario quando si devono produrre enormi quantità di biomassa per prove di inoculazione su aree di grande superficie.

Supportazione della biomassa microbica

Benchè risultati positivi siano stati ottenuti con applicazione diretta ai semi, alle plantule ed al suolo di brodi colturali di *Azospirillum* (31-44-45), è molto più difficile in questo modo ottenere la colonizzazione delle radici, soprattutto se i semi inoculati vengono trattati con pesticidi o fertilizzanti minerali che possono danneggiare seriamente la vitalità dei microrganismi.

Ciò può spiegare gli insuccessi e la inconsistenza dei risultati ottenuti da alcuni autori.

Risulta quindi opportuno nella preparazione degli inoculanti, assicurare la conservazione della biomassa microbica per un tempo sufficientemente lungo senza apprezzabili perdite di vitalità ed efficienza azotofissatrice.

Ciò è stato ottenuto facendo adsorbire la biomassa su adatti supporti che assicurano inoltre la facilità di trasporto dell'inoculante, una efficace distribuzione ai semi ed al suolo e contemporaneamente una protezione al microrganismo durante la prima permanenza nel terreno. Sulla base delle sperimentazioni effettuate in campo in Israele (32-33-34), India (46) ed Italia (FAVILLI ricerche non pubblicate) fin dal 1979-80 vengono a tutt'oggi proposti come più adatti supporti per la biomassa di *Azospirillum* due tipi di materiali: torba neutralizzata con CaCO_3 fino a pH 6,8 ed una miscela di letame e terra (rapporto 1:1).

La torba essicata, macinata, portata a pH 6,8 con CaCO_3 e sterilizzata viene inoculata con una sospensione di *Azospirillum* in modo che la concentrazione finale abbia titolo di 1×10^9 unità formanti colonie (C.F.U.) $\cdot \text{g}^{-1}$, e l'umidità del preparato il 40%.

La conservazione del supporto inoculato, a temperatura ambiente in sacchetti di polietilene, mantiene vitali ed attivi gli azospirilli per circa 3 mesi. Dopo tale tempo la concentrazione cellulare finale è pari a 1×10^6 C.F.U. $\cdot \text{g}^{-1}$ (KAPULNIK, comunicazione personale).

Per la preparazione del supporto a base di terra e letame si utilizzano terra prelevata in campo e letame bovino fresco.

Il letame essiccato all'aria, macinato, vagliato e sterilizzato, viene miscelato alla terra vagliata in rapporto 1:1, ed irrorato con una sospensione di azospirilli contenente 1×10^{10} cellule $\cdot \text{ml}^{-1}$ in modo da ottenere una concentrazione finale pari a 4×10^8 cellule $\cdot \text{g}^{-1}$ ed una umidità del 40%.

Nel supporto inoculato tenuto per 2-3 giorni a temperatura di 28-32°C

si realizza una moltiplicazione cellulare che porta la concentrazione di azospirilli a 1×10^9 o 1×10^{11} cellule $\cdot g^{-1}$. Dopo che l'inoculante può essere conservato in sacchetti di polietilene sigillati per circa 180 giorni senza diminuzioni apprezzabili di vitalità ed efficienza (45).

Il letame rappresenta, per gli azospirilli, un habitat particolarmente idoneo nel quale essi vivono ed operano in sinergismo con altri microrganismi ai quali in cambio di composti organici metabolizzabili forniscono azoto (47).

Nelle prove di inoculazione in campo di cereali e graminacee foraggere effettuate in Israele fin dal 1978-79 è stato utilizzato il supporto a base di torba (32-33-34) mentre il supporto a base di letame è stato utilizzato in India (46) e nel nostro Centro per prove di campo con cereali.

La batterizzazione dei cereali con *Azospirillum* può essere effettuata mediante l'applicazione diretta del supporto inoculato al seme (metodo per spolveramento o dell'inoculo semisolido) od indiretta, quando cioè l'inoculo viene applicato al terreno subito dopo la semina o dopo l'emergenza delle piantine.

Applicazione diretta al seme

Nella batterizzazione per spolveramento i semi, prima di essere inoculati, devono essere trattati con adesivi a base di gomma arabica (100 ml di soluzione al 15% per Kg di seme) o di carbossimetil-cellulosa (soluzione al 1,5%) in modo da poter trattenere alla superficie il supporto inoculato con il quale vengono accuratamente miscelati. La miscelazione può essere fatta a mano, per piccole quantità di seme oppure utilizzando una betoniera quando le quantità di seme sono dell'ordine di 1 o 2 q.li (Fig. 2).

La quantità di supporto inoculato da aggiungere al seme varia da 30 a 5 g. Kg^{-1} a seconda della grossezza del seme.

Col metodo dell'inoculo semisolido (slurry inoculation) il supporto inumidito con acqua in modo da formare una pasta viene miscelato ai semi.

Con 100 g di supporto si possono inoculare da 4 a 20 Kg di seme. I semi dopo il trattamento inoculante devono essere immediatamente seminati od al massimo conservati per una notte effettuando la semina il giorno dopo.

Questi metodi di inoculazione risultano comodi e vantaggiosi perchè non richiedono attrezzature speciali ed i semi possono essere seminati con una normale seminatrice.

Eventuali svantaggi possono essere la necessità di asciugare i semi al riparo della luce, il lavoro accurato necessario e il bisogno di reinoculare se i semi trattati non vengono seminati entro 24-36 h e la scarsa efficacia se si impiegano semi trattati con fungicidi ed insetticidi.

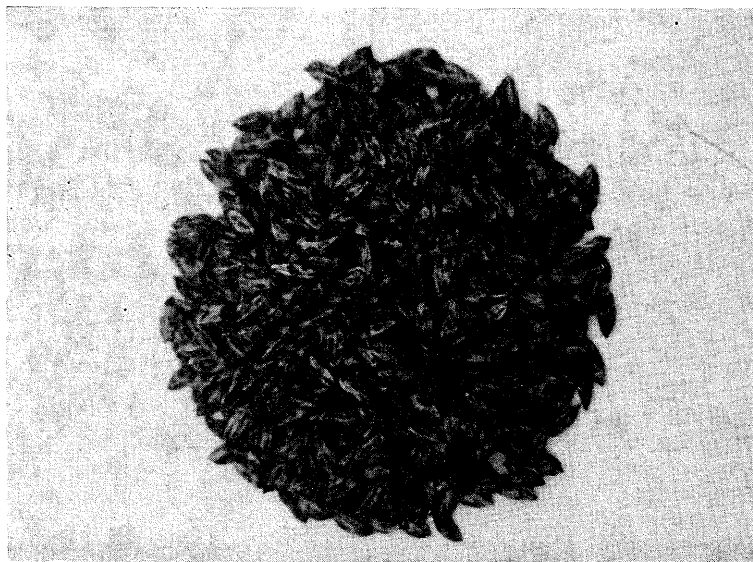


Fig. 2. — Semi di riso batterizzati con *Azospirillum* supportato su miscela letame-terra (1:1).

Applicazione dell'inoculante al suolo

L'inoculazione al suolo viene effettuata con sospensioni in acqua di supporto inoculato distribuite lungo le file delle piante (piantine con due foglie) seguita immediatamente da irrigazione con 15 mm di acqua della superficie inoculata.

Per la batterizzazione di 100 m² di terreno occorrono da 25 a 100 g di inoculante sospeso in un volume di 6-20 litri di acqua ed irrorato uniformemente sull'area; si calcola che ogni pianta riceva così 1×10^5 cellule di *Azospirillum*.

Questo sistema di inoculazione è semplice da applicare in quanto richiede solo poche modifiche alla seminatrice, ma non sembra pratico per applicazioni su aree molto estese.

Responso alle prove di inoculazione in campo con Azospirillum

Dopo aver esposto la tecnologia di preparazione e di applicazione degli azospirilli ai cereali vengono passati in rassegna alcuni dei risultati più significativi ottenuti negli ultimi 5-6 anni in prove di batterizzazione con *Azospirillum* di cereali in condizioni di pieno campo (Figg. 2-3-4-5).



Fig. 3. —Parcelle sperimentali per le prove in campo di batterizzazione del grano con *Azospirillum* (Piacenza, 1984).



Fig. 4. — Parcelle testimone. Grano non batterizzato (Piacenza, 1984).



Fig. 5. — Parcella con grano batterizzato con *Azospirillum* (Piacenza, 1984).

L'indice di valutazione si riferisce alla differenza percentuale, rispetto al controllo non inoculato, del parametro considerato che può essere rappresentato dall'incremento nella resa o nel contenuto in sostanza secca o in azoto del prodotto. Viene inoltre indicato il metodo di inoculazione impiegato.

Vengono riportati separatamente i risultati delle prove di batterizzazione con *Azospirillum* dei più importanti cereali, effettuate in Paesi stranieri, (tab. 2 e 3) su mais, riso, orzo, avena e grano ed in Italia (tab. 4) su riso, grano, mais, orzo.

I risultati delle prove di inoculazione dei cereali con *Azospirillum*, in condizioni di pieno campo, anche se in qualche caso sono statisticamente non significativi, dimostrano l'effettivo beneficio sulla coltura di questa pratica.

Con l'inoculazione di *Azospirillum* è stato possibile ottenere, con una riduzione del 30-50% delle dosi di fertilizzanti azotati, rese dei raccolti uguali od anche superiori a quelle che si ottengono con la concimazione azotata completa, realizzando così un notevole risparmio nella spesa dei fertilizzanti.

Tabella 2. — Responsi dell'inoculazione in campo con *Azospirillum* di mais, riso, orzo, avena.

Località	Coltura	Anno	Parametro	Differenza rispetto al controllo	Metodo di inoculazione
FLORIDA BURRIS et al. (1978) (48)	17 cultivar di mais	1975	sostanza secca	risultati positivi e neagtivi ns	brodo colturale applicato al suolo
ISRAELE KAPULNIK et al. (1981) (32)	Mais c.v. Jubilee	1979	granella	+ 8-14%	supporto inoculato in sospensione applicato al suolo
	Mais c.v. Hazera	1979	sostanza secca	+ 23%	«
	Mais (foraggio)	1979	peso fresco	+ 18%	«
BRASILE BODDEY e DÖBBEREINER (1982) (31)	Mais	1980	sostanza secca	+ 19% ns	«
			azoto totale	+ 20% ns	
INDIA SUBBA RAO (1981) (44)	Riso	1978	granella	+ 6-17%	applicazione diretta del supporto inocuato al seme
	Orzo	1978	granella	+ 12-26%	«
	Avena	1978	granella	+ 9-12%	«

Tabella 3. — Responso dell'inoculazione in campo con *Azospirillum* di grano.

Località	Coltura	Anno	Parametro	Differenza rispetto al controllo	Metodo di inoculazione
ISRAELE KAPULNIK et. al. (1983) (34)	grano	1978	granella	+ 11%	supporto inoculato in sospensione applicato al suolo
	grano	1979	granella	+ 8%	«
	grano	1979	granella	+ 7%	«
	grano (foraggio)	1979	peso secco	+ 19,6%	«
	grano	1980	granella	ns	«
	grano	1981	granella	+ 6%	«
	grano	1981	granella	+ 17,6%	«
	grano	1982	granella	+ 10%	«
INDIA SUBBA RAO (1981) (44)	grano	1978	granella	+ 9-30%	supporto inoculato applicato direttamente al seme
RAI e al. (1982) (49)	grano	1981	granella	+ 25%	«
EGITTO HEGAZI e al. (1981) (50)	grano	1980	granella	+ 270%	inoculazione con brodo culturale dei semi
			sostanza secca	+ 176%	«
BRASILE BODDEY e DÖBEREINER (1982) (31)	grano	1981	sostanza secca	ns	
			azoto totale	ns	
BELGIO VLASSAK e REYNDERS (1981) (30)	grano	1979	granella	+ 9-15%	inoculazione con brodo culturale dei semi

Tabella 4. — Responso delle prove in campo di inoculazione con *Azospirillum* di riso, grano, mais, orzo, avena, effettuate in Italia.

Località	Coltura	Anno	Parametro	Differenza rispetto al controllo	Metodo di inoculazione
PAVIA FAVILLI e al. (1980) (51)	riso	1979	granella	+ 17%	inoculazione dei semi con brodo colturale
FIRENZE	grano	1979	granella	+ 47-54% ns	«
LIVORNO	grano	1979	granella	+ 13-54% ns	«
PAVIA FAVILLI, dati non pubblicati	mais c.v.: Rx42	1982	granella	+ 12%	supporto inoculato applicato al seme
	padano	1982	granella	+ 20%	«
	adige	1982	granella	+ 20%	«
PIACENZA	grano	1982	granella	+ 5% ns	«
	orzo	1982	granella	+ 8% ns	«
PIACENZA	grano	1984	granella	+ 38%	«
PIACENZA	orzo	1984	granella	+ 22%	«

Conclusioni

Le specie di *Azospirillum* rappresentano quindi microrganismi con un enorme potenziale di impiego come inoculanti per cereali economicamente importanti.

Con l'inoculazione *Azospirillum* colonizza e prolifera sulle radici provocando l'aumento della superficie radicale ed incremento della capacità di assorbimento dell'acqua e dei minerali. Ciò provoca un più veloce accumulo di sostanza secca nelle piante e di conseguenza una più alta produzione.

Come risultato della inoculazione l'azotofissazione radicale contribuisce alla nutrizione azotata delle piante soprattutto dopo la fioritura ed all'aumento del contenuto in azoto del suolo. Molto resta ancora da fare, sia per quanto riguarda la comprensione del meccanismo e della dinamica della colonizzazione ed ottimizzazione della combinazione batteri-pianta-terreno sia per standardizzare la biotecnologia di produzione e di applicazione dell'inoculante.

I risultati incoraggianti finora ottenuti fanno sperare che in breve tempo sarà anche possibile sviluppare una normativa in grado di garantire procedure uniformi e riproducibili nel controllo, ricerca ed applicazione degli inoculanti azospirillici.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DART P.J., DAY J.M. (1975) — In: *Soil microbiology a critical revue*. Walker N. (Editor) Butterworths.
- (2) RINAUDO G., BALANDREAU J., DOMMERGUES Y. (1971) — In: *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. Plant and soil (special volume). Lie T.A., Mulder E.G. (eds) p. 471.
- (3) DOMMERGUES Y., BALANDREAU J., RINAUDO G., WEINARD P. (1973) — *Soil biol.* 5, 83.
- (4) DÖBEREINER J., DAY J.M. (1975) — Proc. Intern. Symp. of N₂-fixation Interdisciplinary discussion. Washington State Univ. Press.
- (5) NELSON A.D., BARBER L.E., TJEPEKEMA J., RUSSEL S.A., POWELSON R., EVANS H.J. (1976) — *Canad. J. Microbiol.*, 22, 523.
- (6) BARBER L.E., EVANS H.J. (1976) — *Canad. J. Microbiol.*, 22, 254.
- (7) FAVILLI F., CAROPPO S., SILI C., BALLONI W., (1977) — Comunicazione presentata al XXII Convegno TUEMA, Bologna, Febbraio 1977.
- (8) QUISPEL A. (1977) — Enciclop. Scienza e tecnica. Mondadori A. Editore.
- (9) MARX J.L. (1975) — *Science*, 189, 368.
- (10) DÖBEREINER J., MARRIEL J.E., NERY M. (1976) — *Canad. J. Microbiol.*, 22, 1464.
- (11) TYLER M.E., MILAM J.R., SMITH R.L., SCHANK S.C., ZUBERER D.A. (1979) — *Canad. J. Microbiol.*, 25, 693.
- (12) VLAŠSÁK K., REYNDERS L. (1981) — In: *Associative N₂-fixation*. Vose P.B. Ruschel A.P. (editors), 1, 93. C.R.C. Press.
- (13) HAAHTELA K., WARTIOVAARA T., SKUJINS J. (1981) — *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 203.
- (14) GLATZLE A., MARTIN P. (1981) — In: *Associative N₂-fixation*. Vose P.B., Ruschel A.P. (editors), 1, 28.
- (15) NIOH I. (1982) — *Soil Scienc. Plant nutrit.*, 29, 15.
- (16) RAO A.V., VENKATESWARLU B. (1982) — *Canad. J. Microbiol.*, 28, 778.
- (17) KLOSSAK R.M., BEN BOHLOOL B. (1983) — *Canad. J. Microbiol.* 29, 649.
- (18) FAVILLI F., PELOSI E., MONTAINI P. (1983) — XX Congresso Nazionale Microbiol., Brescia, Gardone Riviera, 12-15 Maggio 1983.
- (19) FAVILLI F., BALLONI W., CRESTA E., MESSINI A. (1984) — In: *Advances in Nitrogen fixation research*. Veeger C., Newton W.E. (editors) p. 339. Nijhoff M., Junk W. Publishers.
- (20) BEIJERINK M.W. (1921) — *Verslagen Koninklijke nederlandse Akademie van Wetenschappen*. Wisen Natuurkundige Afdeling, 30, 431.
- (21) BEIJERINK M.W. (1925) — *Zentr. Bakteriöl. Parasit., Abteilung II*, 63, 353.
- (22) SCHRÖDER (1932) — *Zentr. Bakteriöl. Parasit., Abteilung II*, 85, 177.
- (23) BECKING J.H. (1982) — In: *Azospirillum workshop I*. *Experientia Supplementum* Vol. 42, p. 131. Klingmuller W. I. (ed) Birkhauser Verlag. Basel.
- (24) BECKING J.H. (1962) — *Proceed. 8th Intern. Congr. Microbiology, Montreal, Canada, Abstract B 14, 5*.
- (25) BECKING J.H. (1963) — *Soil Science*, 118, 196.
- (26) TARRAND J.J., KRIEG N.R., DÖBEREINER J. (1978) — *Canad. J. Microbiol.*, 24, 967.
- (27) MAGALHAES F.M.M., BALDANI J.I., DÖBEREINER J. (1983) — *Ann. Acad. Brasil. Sci.* 55, (4), 417.
- (28) DÖBEREINER J. (1983) — In: *Azospirillum workshop II*. *Experientia supplementum* Vol. 48, p. 10. Klingmuller W. (editor), Birkhauser Verlag. Bern.

- (29) KLUCAS R.V., DÖBEREINER J. (1981) — In: *Associative N₂-fixation*. Vose P.B., Ruschel A.P. (editors) Vol. 2, 243. C.R.C. Press.
- (30) VLASSAK K., REYNERS L. (1981) — In: *Current perspective in nitrogen fixation*. Gibson A.H., Newton W.E. (editors). Australian Academy of Science, Canberra. P. 494.
- (31) BODDEY R.M., DÖBEREINER J. (1982) — 12th Congress of Soil Science, New Delhi, India p. 28.
- (32) KAPULNIK Y., SARIG S., NUR I., OKON Y., KIGEL J., HENIS Y. (1981) — *Exp. Agric.* 17, 179.
- (33) KAPULNIK Y., SARIG S., OKON Y. (1982) — *Canad. J. Microbiol.* 29, 895.
- (34) KAPULNIK Y., OKON Y. (1983) — In: *Azospirillum workshop II*. *Experientia supplementum* vol. 48, p. 163. Klingmuller W. (Editor), Birkhauser Verlag. Bern.
- (35) FLORENZANO G. (1983) — *Fondamenti di microbiologia del terreno*. Reda.
- (36) FLORENZANO G., FAVILLI F. (1984) — *Giornale di agricoltura*. 6, 40.
- (37) PATRIQUIN D.G. (1982) — *Canad. J. Microbiol.*, 29, 900.
- (38) LAMM R.B., NEYRA C.A. (1981) — *Canad. J. Microbiol.* 27, 1320.
- (39) DÖBEREINER J., BALDANI V.L. D. (1979) — *Canad. J. Microbiol.* 25, 1264.
- (40) SCHUBERT K.R., EVANS H.J. (1976) — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1207.
- (41) HARTMANN A., FUSSEDER A., KLINGMULLER W. (1983) — In: *Azospirillum workshop II*. *Experientia supplementum* vol. 48, p. 78. Klingmuller W. (editor), Birkhauser Verlag. Bern.
- (42) OKON Y., ALBRECHT S.L., BURRIS R.H. (1976) — *Appl. Envir. Microbiol.* 33, 85.
- (43) FAVILLI F., ENA A. (1980) — *Atti XIX Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol.* p. 393.
- (44) REYNERS L., VLASSAK K. (1982) — *Plant and Soil.* 66, 217.
- (45) SMITH R.L., BOUTON J.H., SCHANK S.C., QUESENBERRY H.H., TYLER M.E., MILAM J.R., GASKINS M.H., LITTEL R.C. (1976) — *Science* 193, 1003.
- (46) SUBBA RAO N.S. (1981) — In: *Associative N₂-fixation*. Vose P.B., Ruschel A.P. (editors), Vol. 1, p. 137. C.R.C. Press.
- (47) CRESTA E., FAVILLI F. (1984) — Comunicazione presentata al colloquio su « Biotecnologia del suolo », Firenze 11 Dicembre 1984.
- (48) BURRIS R.H., ALBRECHT S.L., OKON Y. (1978) — In: *Limitation and potential for biological nitrogen fixation in the tropics*. Döbereiner J., Burris R.H., Hollaender A. (editors) Plenum Press New York p. 303.
- (49) RAI S.N., GAUR A.C. (1982) — *Plant and Soil.* 69, 233.
- (50) HEGAZI N.A., KHAWAS H., MONIB M. (1981) — In: *Current perspectives in nitrogen fixation*. Gibson A.A., Newton W.E. (editors) Australian Academy of Science. Canberra. p. 453.
- (51) FAVILLI F., BALLONI W., SAVOINI G. (1980) — *Atti XIX Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol.* Catania, Giugno 1980.

GLI ATTINOMICETI DEL GEN. **FRANKIA**: METODI D'ISOLAMENTO E D'INOCULAZIONE

M.C. MARGHERI, M.R. TREDICI, G. FLORENZANO

Istituto di Microbiologia agraria e tecnica - Università
e Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - C.N.R., Firenze.

RIASSUNTO

L'interesse per lo sfruttamento delle simbiosi azotofissatrici nelle non leguminose si è intensificato negli ultimi anni dopo l'ottenimento in coltura pura dell'endofita di *Comptonia peregrina* cui ha fatto seguito l'isolamento da altre specie nodulate (*Alnus*, *Casuarina*, *Elaeagnus*, *Hipophaë*, *Myrica*, *Purshia*, *Colletia* e *Ceanothus* spp.).

A tutt'oggi, mentre il genere *Frankia* risulta validamente caratterizzato, le incomplete conoscenze sulla biologia di questi attinomiceti simbiotici e il relativo scarso numero di isolati non consentono una razionale definizione delle specie.

Le richieste nutrizionali complesse e non definite insieme alla crescita lenta rendono particolarmente aleatorio l'isolamento di *Frankia*. Infatti, nonostante i molteplici tentativi condotti a partire dagli anni '50, il primo isolamento, confermato secondo i postulati di Kock, si è avuto solo nel 1978 (*Frankia* CpI1 da *Comptonia peregrina*).

Le varie tecniche di isolamento recentemente adottate con risultati positivi, (diluizione seriale, micro-dissezione, digestione enzimatica, frazionamento con Sephadex e frazionamento a gradiente di saccarosio) non hanno comunque dimostrato validità generale.

Le esperienze da noi condotte hanno portato all'isolamento di numerosi ceppi di *Frankia* da *Alnus cordata* ed *Elaeagnus angustifolia*, su alcuni dei quali si sono iniziate le prove di caratterizzazione nutrizionale e fisiologica.

È stata infine messa a punto la procedura di preparazione degli inoculi da ceppi selezionati di *Frankia* e di trattamento delle piantine axeniche.

SUMMARY

The isolation and *in vitro* cultivation of actinomycetes of the genus *Frankia* has always been difficult and, at present, strains from only half of the actinorhizal symbiosis known to exist have been obtained and studied in pure culture.

For a complete characterization of the genus *Frankia* and a clearly definition of the species, isolates from a larger majority of the symbiosis are needed. Our work had led to the isolation of many *Frankia* strains from *Alnus cordata* and *Elaeagnus angustifolia*, whose cultural and physiological characterization is in progress in our laboratory. Furthermore methods for the preparation of infective, standardized inoculants from selected *Frankia* strains and for seedlings infection were developed.

INTRODUZIONE

Simbiosi radicali azotofissatrici con attinomiceti del genere *Frankia* sono state accertate in numerose angiosperme dicotiledoni perenni appartenenti a 8 famiglie e 21 generi (Tab. 1). La loro distribuzione geografica interessa prevalentemente le regioni temperate; nelle zone tropicali, ad eccezione di alcune specie di *Casuarina*, la loro diffusione è limitata alle quote più elevate.

Tab. 1. — Angiosperme non leguminose provviste di attinorrizze. (LECHEVALIER M.P., 1983) (10).

Ordine	Famiglia	Genere	N. di specie accertate come nodulate (fra parentesi il N. delle specie)
Casuarinales	Casuarinaceae	<i>Casuarina</i>	22 (45)
Coriariales	Coriariaceae	<i>Coriaria</i>	14 (15)
Fagales	Betulaceae	<i>Alnus</i>	35 (35)
Cucurbitales	Datisceae	<i>Datisca</i>	2 (2)
Myricales	Myricaceae	<i>Myrica</i>	24 (35)
		<i>Comptonia</i>	1 (1)
Rosales	Rosaceae	<i>Rubus</i>	1 (200)
		<i>Cowania</i>	1 (3-4)
		<i>Dryas</i>	3 (4)
		<i>Purshia</i>	2 (2)
		<i>Chamaebatia</i>	1 (2)
		<i>Cercocarpus</i>	4 (20)
Rhamnales	Rhamnaceae	<i>Ceanothus</i>	31 (55)
		<i>Kentrothamnus</i>	1
		<i>Talguenea</i>	1
		<i>Trevoa</i>	2
		<i>Discaria</i>	5 (10)
		<i>Colletia</i>	4 (17)
	Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus</i>	22 (45)
		<i>Hippophaë</i>	1 (3)
		<i>Shepherdia</i>	2 (3)

Le piante attinorriziche contribuiscono in maniera significativa al bilancio azotato di alcuni ecosistemi agrari e forestali; la quantità di azoto fissato, stimata in 15-362 Kg ha⁻¹ anno⁻¹, è paragonabile a quella fornita dalle associazioni *Rhizobium*-leguminose (1).

Per il loro carattere di piante pioniere, molte specie di *Alnus*, *Elaeagnus*, *Hippophaë* e *Ceanothus* trovano sempre più largo impiego nel recupero di terreni marginali e degradati delle regioni temperate.

Particolare interesse selvicolturale rivestono nel nostro Paese, come in altre regioni dell'emisfero settentrionale, le specie del genere *Alnus* per la grande adattabilità alle varie condizioni di clima e terreno e per l'elevata capa-

cità azotofissatrice (300 Kg di azoto fissato ha⁻¹ anno⁻¹ in popolamenti puri di *A. rubra*) (2).

A. rubra, in popolamenti puri, è in grado di dare elevate rese di legname di buona qualità (15-25 tonnellate di biomassa secca ha⁻¹ anno⁻¹); in impianti misti (ad es. con *Populus* e *Pseudotsuga*), *A. rubra*, *A. cordata*, *A. glutinosa*, *A. incana*, promuovono la fertilità del suolo e migliorano, grazie all'apporto azotato, le rese delle piante consociate (3).

Fino a qualche anno fa l'impossibilità di studiare l'endofita in vitro ha limitato lo sviluppo delle conoscenze sulla fisiologia della simbiosi. Dopo l'ottenimento in coltura pura dell'endofita di *Comptonia peregrina* cui ha fatto seguito l'isolamento da altre specie nodulate (*Alnus*, *Casuarina*, *Elaeagnus*, *Hippophaë*, *Myrica*, *Purshia*, *Colletia*, *Ceanothus* spp.) sono iniziati in vari laboratori studi approfonditi sulla fisiologia, biochimica e genetica dei ceppi di *Frankia* e sulle interazioni pianta-microorganismo (specificità verso l'ospite, funzione delle lectine, ruolo dei batteri coadiuvanti, ecc.) (4, 5, 6, 7, 8).

Tuttavia il relativo scarso numero di isolati, da non più della metà delle piante nodulate conosciute, e la notevole variabilità dei ceppi in coltura non consentono a tutt'oggi né una conoscenza esauriente della simbiosi né la razionale definizione della specie di *Frankia* (9).

Dal lato applicativo la ricerca non è che all'inizio: l'isolamento dei ceppi di varia provenienza e il loro studio in coltura pura costituisce la necessaria premessa alla preparazione di inoculi selezionati la cui infettività ed efficienza vanno comunque verificate in prove di campo.

Nella presente nota vengono illustrate le principali metodiche per l'isolamento di *Frankia* e le procedure da noi adottate per l'allestimento degli inoculi e il trattamento delle piantine axeniche.

METODI DI ISOLAMENTO DEI CEPPI DI *FRANKIA*

I principali motivi per cui l'isolamento di *Frankia* dai noduli radicali delle piante ospiti può presentarsi particolarmente difficile si possono riassumere in:

- 1) crescita lenta e richieste nutrizionali complesse e non ben definite della maggior parte dei ceppi soprattutto nella delicata fase di passaggio dalla simbiosi alla coltura in vitro;
- 2) presenza sulla superficie del nodulo di una numerosa popolazione microbica (funghi, batteri e attinomiceti rizosferici) che i trattamenti di sterilizzazione non sempre riescono ad eliminare;
- 3) necessità di ricorrere ad alte densità di semina a motivo della bassa

percentuale nel nodulo di « unità » capaci di svilupparsi sui mezzi di isolamento (11).

Va ricordato inoltre che il rilascio da parte dei tessuti del nodulo di composti fenolici ad attività inibitrice può costituire un ulteriore ostacolo allo sviluppo di *Frankia* (12).

Le tecniche di isolamento correntemente impiegate mirano al superamento di queste difficoltà ed in particolare all'ottenimento di inoculi di *Frankia* liberi da inquinanti.

L'eliminazione, o almeno la riduzione dei contaminanti, viene ottenuta sottoponendo i noduli suddivisi nei singoli lobi a ripetuti lavaggi in acqua e detergente e a trattamenti con agenti sterilizzanti (Tab. 2).

Tab. 2. — Agenti chimici impiegati nella sterilizzazione superficiale dei noduli.

Agente sterilizzante	Concentrazione ‰	Tempo di contatto	Riferimento
Ipoclorito di sodio	5.24	10'	(12)
Clorammina T	1	5'	(11)
Acqua di bromo	0.1	5'	(13)
Cloruro di mercurio	0.1	10'	(14)
Acqua ossigenata	30	15-20'	(13)
Tetrossido di osmio	3	5-6'	(15)

Dopo sterilizzazione superficiale dei noduli si procede alla loro microdissezione o alla loro omogenizzazione. Nel primo caso, per il quale è necessario che i noduli siano completamente esenti da contaminanti, le sezioni possono essere messe direttamente sul mezzo nutritivo agarizzato oppure, secondo il metodo usato da CALLAHAM ed al. (14), possono essere sottoposte ad un trattamento enzimatico con cellulasi e pectinasi. La disaggregazione delle pareti delle cellule corticali così ottenuta libera numerosi « clusters » dell'endofita che, separati mediante filtrazione su tela dai detriti del nodulo, sono seminati sui mezzi nutritivi.

Nel secondo caso, l'omogenato di noduli può venire seminato direttamente secondo la tecnica delle diluizioni seriali oppure può subire, prima della semina, un trattamento di purificazione.

Il frazionamento con Sephadex, tecnica basata sulla gel-filtrazione, è stato proposto da BAKER e coll. (12) come procedura per eliminare dagli omogenati i detriti contaminanti ed i composti fenolici tossici.

Nel frazionamento a gradiente di saccarosio (16) l'omogenato di nodulo (previamente diluito o filtrato attraverso tessuto o lana di vetro) viene centrifugato a gradiente discontinuo di densità (saccarosio al 60%, 45%, 30%). Dopo centrifugazione a 100.000 g per 180', l'endofita risulta concentrato nella

interfaccia fra le frazioni 60% e 45%. Una variante del metodo, che incrementa le probabilità di successo riducendo drasticamente l'incidenza di batteri e funghi inquinanti, prevede la preincubazione dell'omogenato con fenolo allo 0,7% (v/v) per la durata di 10' (17).

Nessuno dei metodi adottati presenta comunque validità generale. Alcuni di essi poi, (es. concentrazione in gradiente di saccarosio, filtrazione su Sephadex) sono caratterizzati da una complessità non sempre giustificata e possono venire validamente sostituiti da tecniche più semplici.

Nell'isolamento di *Frankia* sono stati adoperati sia mezzi definiti che mezzi complessi (Tab. 3). L'impiego di quest'ultimi è determinato dal fatto che, in molti casi, le scarse conoscenze sulla fisiologia dei ceppi di *Frankia* di diversa provenienza non consentono una adeguata definizione delle esigenze nutritive.

D'altra parte esiste una variabilità notevole quanto a richieste nutrizionali anche in ceppi provenienti dalle stesse piante ospiti (20).

I mezzi definiti presentano il vantaggio di una maggiore selettività, particolarmente accentuata in alcuni casi di mezzi minimali che contengono solo sali minerali (con o senza azoto combinato) ed un composto organico come fonte di carbonio.

L'uso di mezzi minimali, rispetto a quelli più ricchi, spesso consente l'ottenimento di un maggiore numero di colonie dell'endofita ed un loro più rapido sviluppo (nostre prove non pubblicate). È da segnalare a questo riguardo la messa in evidenza, per alcuni ceppi di *Frankia*, di un effetto deprimente la crescita esercitato dalla contemporanea presenza nei mezzi colturali di Tween 80 e glucosio (20).

Nel nostro laboratorio, adottando il metodo delle diluizioni seriali, sono stati isolati da diverse piante di *Alnus cordata* e di *Elaeagnus angustifolia* numerosi ceppi di *Frankia* designati rispettivamente come Ac4, Ac20, AcII3, AcII7 e EanI4, EanII3, EanII15 EanII28, EanII57 (¹).

L'adozione di altre tecniche, quali la microdissezione e la semina in QMOD liquido dei noduli trattati con O₃O₄ secondo il metodo di LALONDE ed al. (15), non ha portato a risultati positivi. L'isolamento è stato ottenuto a partire da noduli disinfettati con NaHClO e H₂O₂ ma non con gli altri agenti sterilizzanti o perché troppo drastici (HgCl₂) o perché poco efficaci (clorammina T). L'uso dell'acqua ossigenata, rispetto all'ipoclorito, ha consentito un maggiore controllo degli inquinanti batterici e la totale eliminazione della contaminazione fungina.

(¹) La terminologia da noi usata è da considerarsi provvisoria in attesa di una definitiva accettazione dei criteri di designazione dei ceppi di *Frankia* come proposto nel Convegno: «The Biology of *Frankia* and its Association with Higher plants» tenutosi all'Università del Wisconsin nell'Agosto del 1982 (10).

Tab. 3. — Principali mezzi definiti (DPM, Tween 80/NH₄⁺, BAP) e complessi (QMOD, M-E, M-3) per l'isolamento di *Frankia* (composizione in quantità per litro).

	DPM (17)	Tween 80 /NH ₄ ⁺ (18)	BAP (19)	QMOD (6)	M-E (16)	M-3 (14)
KH ₂ PO ₄	1.0 g		0.95 g			
K ₂ HPO ₄		0.3 g	0.59 g	0.3 g		0.5 g
KCl		0.2 g		0.2 g		
NaH ₂ PO ₄		0.2 g		0.2 g		
NaCl						0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g	0.2 g	0.025 g	0.2 g		0.2 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01 g		0.01 g			
CaCO ₃				0.1 g		0.5 g
NH ₄ Cl		0.02 g	0.27 g			
FeEDTA	1.8 ml	0.2 ml	10 mg			
Citrato ferrico				0.01 g		
Acido citrico				0.01 g		
Estratto di lievito				0.5 g	5.0 g	0.5 g
Peptone				5.0 g		
Acidi casaminici					5.0 g	
Edamina						1 g
Glucosio				10.0 g	10.0 g	
Saccarosio						20 g
Mannitolo						1 g
Acido propionico	0.9 g		0.37 g			
L-α-lecitina di soia				0.5-50 mg		
Tween 80		2.0 g				
Biotina		0.1 mg	0.45 mg			
Acido folico		0.1 mg				
Acido nicotinico		0.1 mg				0.5 mg
Calcio pantotenato		0.1 mg				
Piridossina HCl		0.1 mg				0.1 mg
Riboflavina		0.1 mg				
Tiamina HCl		0.1 mg				0.1 mg
Cianocobalamina					1.6 mg	
H ₃ BO ₃	2.86 mg	1.5 mg	2.86 mg	1.5 mg	1.5 mg	100 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 mg		1.81 mg			25 mg
MnSO ₄ · 7H ₂ O		0.8 mg		0.8 mg	4.5 mg	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 mg	0.6 mg	0.22 mg	0.6 mg	1.5 mg	10 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39 mg		0.025 mg		0.25 mg	0.25 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O		0.2 mg		0.2 mg		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 mg	0.1 mg	0.079 mg	0.1 mg	0.04 mg	0.025 mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049 mg					
CoSO ₄ · 7H ₂ O		0.01 mg		0.01 mg		

L'isolamento di *Frankia* da piante adulte di *E. angustifolia* cresciute in condizioni naturali è stato conseguito solo dopo « peeling » dei noduli previamente disinfettati con H₂O₂; tale trattamento non si è reso necessario per i noduli prelevati da talee di 1 anno inoculate con omogenati di nodulo.

Nelle nostre prove l'impiego del mezzo Tween 80/NH₄⁺ ha dato risultati positivi nell'isolamento dell'attinosimbionte tanto da *A. cordata* che da *E.*

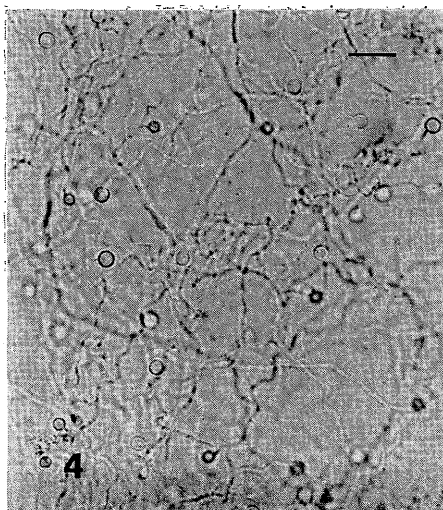
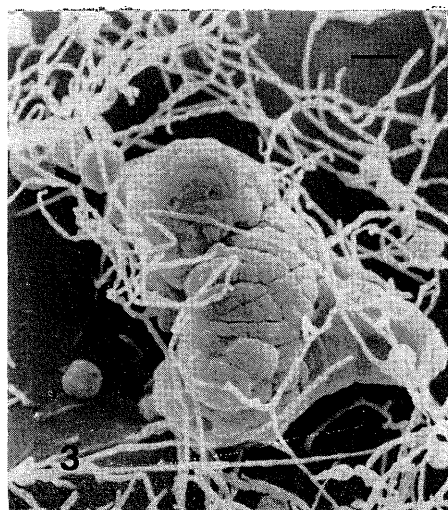
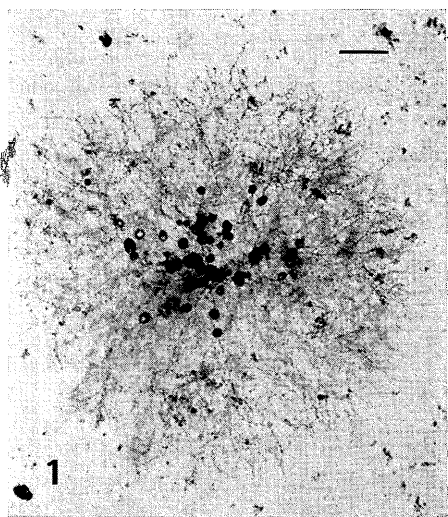


Fig. 1. — Colonia di *Frankia* EanII3 dopo un mese di crescita su mezzo Tween 80/ NH_4^+ agarizzato. Sono riconoscibili numerosi sporangi in differenti stadi di sviluppo. Barra = 50 μm ;

Fig. 2. — Differenziazione di uno sporangio nel ceppo Ac20. Barra = 10 μm ;

Fig. 3. — Sporangio maturo e sporangi in formazione nel ceppo Ac4 (Microfotografia al microscopio elettronico a scansione da un preparato fissato in glutaraldeide, disidratato con etanolo, essiccato al punto critico e ricoperto con oro-pallido). Barra = 4 μm ;

Fig. 4. — Formazione di vescicole nel ceppo EanII3 sul mezzo di isolamento. Barra = 9 μm .

angustifolia. La sua adozione rispetto a quella di mezzi più complessi (QMOD, ME) ha offerto il vantaggio di un più limitato sviluppo di batteri e attinomiceti satelliti sulle piastre di isolamento. Su tale mezzo le colonie di *Frankia*, che compaiono dopo 6-10 gg. e che raggiungono in 20-30 gg il diametro di 1-2 mm, sono ben riconoscibili per il fine intreccio di ife a disposizione raggiata e per l'abbondante sviluppo di sporangi (Figg. 1, 2, 3). Nelle colonie di *Frankia* da *E. angustifolia* si differenziano fino dai primi stadi di sviluppo numerose vescicole (Fig. 4).

COLTURA DI *FRANKIA*

Una vasta letteratura è disponibile sulle influenze di vari parametri (fisici, chimici, nutrizionali), sulla crescita dei diversi isolati di *Frankia*. Da queste ricerche emergono alcune indicazioni di carattere generale: la temperatura ottimale di crescita varia da 28° a 35°C e l'optimum di pH da 6 a 7 (7,5); quanto alle fonti di carbonio utilizzate, la casistica è numerosa ed esiste nei diversi ceppi una notevole variabilità. Propionato, glucosio, acidi casaminici e Tween 80 sono tra i composti più largamente impiegati.

Gli isolati di *Alnus* ottenuti nel nostro laboratorio sono a rapida crescita e sviluppano in modo ottimale su QMOD e su QMOD/addizionato di Tween 80 (0.2%) (21).

Gli isolati da *Elaeagnus*, tutti a crescita lenta, sviluppano su mezzo Tween 80/NH⁺₄ addizionato di acetato (1,5 g l⁻¹) o propionato e su mezzo L/2 (1) modificato per sostituzione dell'albumina con edamina (1 g l⁻¹) e aggiunta di acetato (1,5 g l⁻¹) o propionato (1,5 g l⁻¹). Non si ha crescita su QMOD. Lo sviluppo su mezzi liquidi è inferiore rispetto a quello ottenuto sugli stessi mezzi semisolidi.

Per tutti i ceppi isolati sono in corso prove di crescita su diverse fonti di carbonio, ma già da queste prime indicazioni si può dedurre l'appartenenza dei ceppi da *A. cordata* ed *E. angustifolia* a due gruppi nutrizionali distinti. Lechevalier (9) ha proposto la suddivisione degli isolati di *Alnus* e *Comptonia* in due gruppi fisiologici, secondo caratteri differenziali che vengono riportati in Tab. 4, nei quali tuttavia non rientrano i ceppi da noi isolati. Lo schema proposto da Lechevalier, pur rappresentando un valido ausilio, non è generalizzabile ed è logico attendersi, con il prosieguo degli studi di caratterizzazione degli isolati di diversa origine, la definizione di nuovi gruppi fisiologici.

Tab. 4. — Tipi fisiologici A e B in *Frankia*. (LECHEVALIER M.P., 1984) (9).

Caratteri	A	B
Pigmenti cellulari	+	—
Vescicole	Variabile su mezzi complessi	+ su mezzo senza azoto con succinato
Sinergismo		
Tween + carboidrato	—	+
Depressione crescita		
Tween + carboidrato	+	—
Utilizzazione carboidrato allo 0,5%	+	—
Mantenimento su striscio	+	—
Infettività sull'ospite originario	—	+ (solitamente)
Gruppo sierologico	II o altro	I
Zuccheri cellulari	Vari (fucosio, madurosio, xilosio, glucosio, galattosio)	Xilosio

INOCULAZIONE DELLE PIANTINE

L'infettività (produzione di noduli) e l'efficacia (attività nitrogenasica nel nodulo) dei ceppi isolati viene verificata mediante reinoculazione di piantine axeniche della specie ospite.

Nelle nostre esperienze su *Alnus cordata* le piantine vengono ottenute da semi sterilizzati in superficie con ipoclorito di sodio e posti a germinare su agar-acqua in tubi 16 x 160 mm.

Le plantule axeniche allo stadio della prima fogliolina vera sono trasferite in provettoni di 50 x 300 mm contenenti sabbia umidificata con soluzione di Crone esente da azoto combinato (16). Successivamente le piante vengono inoculate con una sospensione del simbionte e poste a sviluppare a 22°C e a 5000 lux in alternanza luce-buio 12:12 ore.

Dopo 4-6 settimane le piantine sono esaminate per controllare la produzione di noduli e l'attività azotofissatrice (Figg. 5, 6). Al fine della riproducibilità dei risultati, la preparazione degli inoculi per il test di infettività viene condotta secondo una procedura standard. Colonie di *Frankia*, da colture di 4 settimane su mezzo QMOD liquido vengono trasferite in tubi 18 x 150 mm contenenti 15 ml dello stesso terreno colturale e poste ad incubare a 28°C per 4 settimane. Le colonie fiocose e biancastre sviluppate in ciascun tubo vengono lavate per filtrazione con 10 ml di tampone fosfato (50 mM di K-fosfato, pH 7 e trasferite in 10 ml di soluzione di Crone, priva di azoto combinato. Successivamente le colonie vengono omogenizzate e l'inoculante così ottenuto, costituito da ife, sporangi e spore libere, viene applicato in ragione di 0,5 ml per pianta.

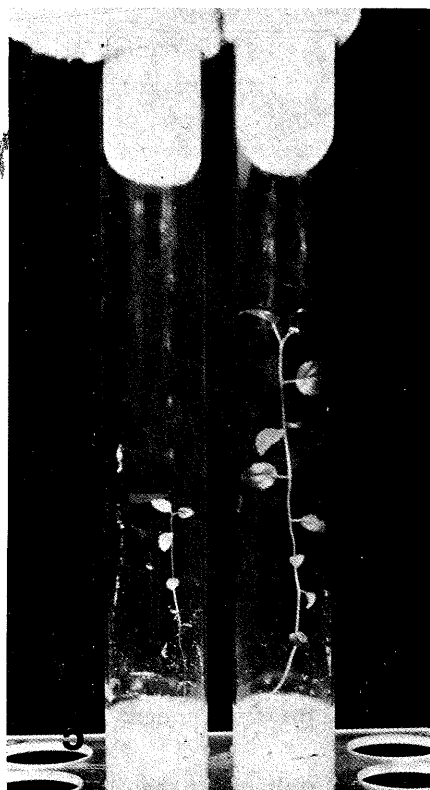


Fig. 5. — Piantine di *Alnus cordata* di 4 settimane cresciute in condizioni gnotobiotiche su mezzo privo di azoto combinato: a destra piantina inoculata con il ceppo AC20; a sinistra controllo non inoculato.

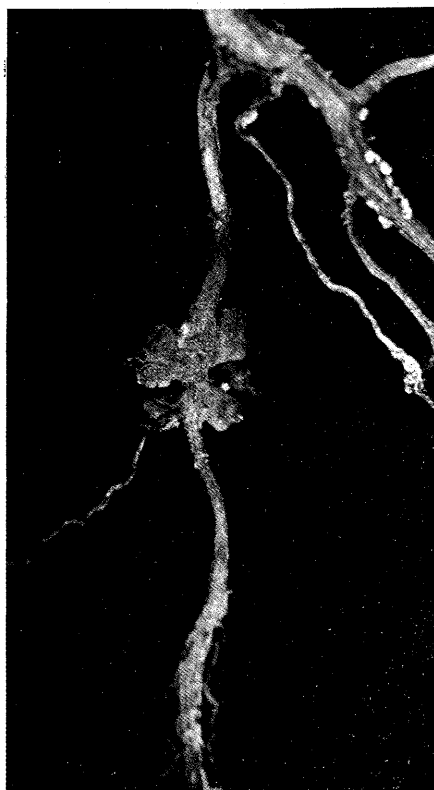


Fig. 6. — Particolare di radice nodulata dopo 2 mesi dalla inoculazione.

PRODUZIONE DI INOCULANTI DI *FRANKIA*

L'ottenimento di ceppi di *Frankia* in coltura pura rende possibile la preparazione di inoculanti selezionati per le applicazioni in selvicoltura in sostituzione della pratica di inoculazione con omogenati di nodulo.

L'ottimizzazione dei parametri chimico-fisici, oltre che nutrizionali, che regolano la crescita dei ceppi di *Frankia* è la necessaria premessa alla produzione massiva di inoculanti.

In tale ambito una ricerca preliminare è stata da noi condotta per definire l'influenza sulla crescita di *Frankia* dell'agitazione e della concentrazione di

O₂ nella fase gassosa. Le prove sono state condotte in beute ermeticamente chiuse contenenti 50 ml di mezzo QMOD liquido, inoculato con 50 mg l⁻¹ (p.s.) di *Frankia* Ac20, tenute a 28°C in condizioni statiche ed in agitazione.

I risultati, riportati in tabella 5, evidenziano la maggior crescita che si ottiene a concentrazioni di O₂ comprese fra 5 e 20% e soprattutto la depressione dello sviluppo in condizioni statiche. È da rilevare infine come in ogni caso la crescita sia stata particolarmente lenta (tempo di raddoppiamento di

Tab. 5. — Crescita di *Frankia* Ac20 in coltura « batch » a diverse concentrazioni di O₂ in condizioni statiche e in agitazione.

Atmosfera	Condizioni di coltura	Concentrazione cellulare dopo 10 giorni di crescita (mg p.s. l ⁻¹)
argon + 1,25% O ₂	in agitazione	430
argon + 5,0% O ₂	in agitazione	500
argon + 10,0% O ₂	in agitazione	520
aria	in agitazione	520
aria	statica	350

poco inferiore ai 3 giorni), caratteristica questa tipica di tutte le colture di *Frankia*.

Da esperienze condotte da MURRY e coll. (19) è possibile rilevare come la coltura in « batch » non sia comunque appropriata alla produzione di inoculanti di *Frankia* sia per la lunga fase di latenza che la caratterizza (maggiore di 2 giorni) sia per la breve durata della fase esponenziale a cui fa seguito, specialmente sui mezzi definiti, una fase di autolisi cellulare.

D'altra parte nelle colture in « batch » si ha, alla fine della fase esponenziale, una massiva formazione di spore che costituisce elemento positivo sia in quanto aumenta il numero delle « unità », infettive, sia perché migliora le caratteristiche di sopravvivenza degli inoculi (dati non pubblicati).

CONCLUSIONI

Malgrado l'importanza delle piante attinorizziche superi in molti ambienti quella delle leguminose, le ricerche in questo campo hanno segnato il passo fino a qualche anno fa, essenzialmente per l'impossibilità di studiare l'endofita in vitro. È naturale quindi che, nonostante la grande mole di lavoro svolta ed i risultati ottenuti a partire dal 1978, con l'ottenimento dell'endofita in coltura pura, il divario di conoscenze sulle simbiosi attinorizziche rispetto a quelle *Rhizobium* - leguminose, risulti tuttora notevole. In effetti la manipolazione e la coltura degli attinomiceti simbiotici è soltanto ai primordi.

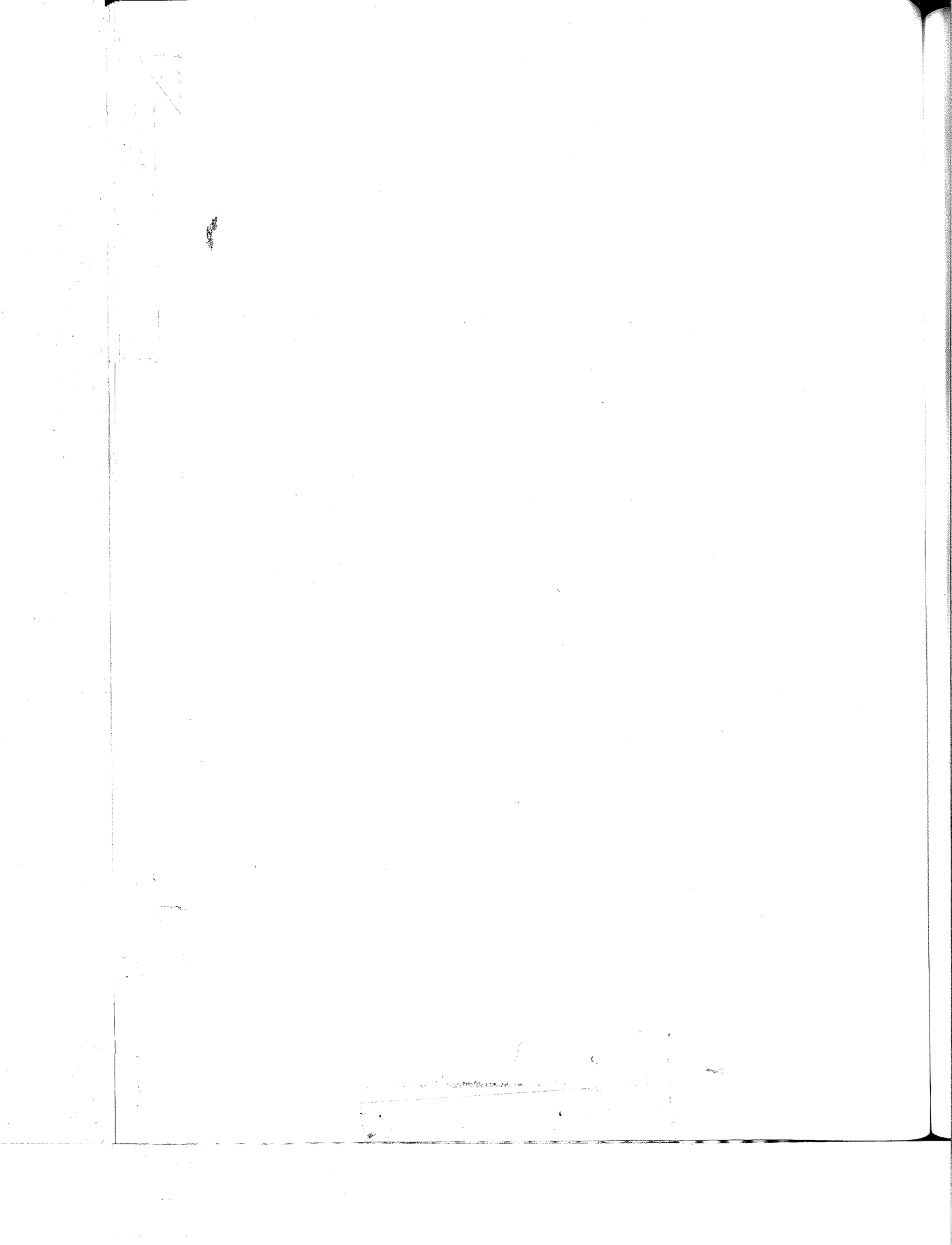
Gli sviluppi futuri dipenderanno non solo dal livello delle conoscenze sulla fisiologia del *Frankia* ma anche dall'ottenimento di un maggior numero di ceppi in coltura pura, dalla definizione dei gruppi di inoculazione incrociata e dalla migliore comprensione dei rapporti pianta-microorganismo.

Con il simultaneo progresso della coltura dei tessuti vegetali, la nodulazione in vitro di piante attinorriziche avrà importanti implicazioni agronomiche ed ecologiche nelle forestazioni e nella produzione di biomassa (22).

BIBLIOGRAFIA

- (1) LECHEVALIER M.P., HORRIÈRE F. and LECHEVALIER H. (1982) — *The biology of Frankia and related organisms*. Dev. Ind. Microbiol. 23, 51-60.
- (2) BECKING J.H. (1977) — *Dinitrogen-fixing associations in higher plants other than legumes*. In: *A treatise on dinitrogen fixation*. Section III: Biology (R.W.F. HARDY and W.S. SILVER eds.) pp. 185-275, J. Wiley, New York.
- (3) GORDON J.C. and DAWSON J.O. (1979) — *Potential uses of nitrogen-fixing trees and shrubs in commercial forestry*. Bot. Gaz. 240 (Suppl.), S85-S90.
- (4) AKKERMANS A.D.L., HAFPEZ F., ROELOFSEN W., CHAUDHARY A.H. and BAAS R. (1984) — *Ultrastructure and nitrogenase activity of Frankia grown in pure culture and in actinorrhizae of Alnus, Colletia and Datisca spp.* In: *Advances in nitrogen fixation research* (C. Veeger and W.E. Newton eds.) pp. 311-319. M. Nijhoff, W. Junk, The Hague.
- (5) LECHEVALIER M.P., BAKER D. and HORRIÈRE F. (1983) — *Physiology, chemistry, serology and infectivity of two Frankia isolated from Alnus incana subsp. rugosa*. Can. J. Bot. 61, 2826-2833.
- (6) LALONDE M. and CALVERT H.E. (1979) — *Production of Frankia hyphae and spores as an infective inoculant for Alnus species*. In: *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests* (J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry eds.) pp. 95-110. Oregon State University, Corvallis.
- (7) CHABOUD A. and LALONDE M. (1983) — *Lectin binding of surfaces of Frankia strains*. Can. J. Bot. 61, 2889-2897.
- (8) KNOWLTON S., BERRY A. and TORREY J.G. (1980) — *Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorrhizal plants by Frankia*. Can. J. Microbiol. 26, 971-977.
- (9) LECHEVALIER M.P. (1984) — *The taxonomy of the genus Frankia*. Plant and Soil, 78, 1-6.
- (10) LECHEVALIER M.P. (1983) — *Cataloging Frankia strains*. Can. J. Bot. 61, 2924-2967.
- (11) DIEM H.G., GAUTHIER D. and DOMMERGUES Y.R. (1982) — *Isolation of Frankia from nodules of Casuarina equisetifolia*. Can. J. Microbiol. 28, 526-530.
- (12) BAKER D., KIDD G.H. and TORREY J.G. (1979) — *Separation of actinomycete nodule endophytes from crushed nodule suspension by sephadex fractionation*. Bot. Gaz. 140 (Suppl.), S49-S51.
- (13) BERRY A. and TORREY J.G. (1979) — *Isolation and characterization in vivo and in vitro of an actinomycetous endophyte from Alnus rubra Bong.* In *Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests* (J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry eds.) pp. 69-83. Oregon State University, Corvallis.
- (14) CALLAHAM D., DEL TREDICI P. and TORREY J.G. (1978) — *Isolation and cultivation*

- in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science*, 199, 899-902.
- (15) LALONDE M., CALVERT H.E. and PINE S. (1981) — *Isolation and use of Frankia strains in actinorhizae formation*. In *Current perspectives in nitrogen fixation* (A.H. Gibson and W.E. Newton eds.) pp. 295-299, Australian Academy of Science, Canberra.
 - (16) BAKER D., TORREY J.C. and KIDD G.H. (1979) — *Isolation by sucrose density fractionation and cultivation in vitro of actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules*. *Nature*, London, 281, 76-78.
 - (17) BAKER D. and O'KEEFE D. (1984) — *A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples*. *Plant and Soil*, 78, 23-28.
 - (18) BLOM J., ROELFSEN W. and AKKERMANS A.D.L. (1980) — *Growth of Frankia Avc11 on media containing Tween 80 as C-source*. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 131-135.
 - (19) MURRY M.A., FONTAINE M.S. and TORREY J.G. (1984) — *Growth kinetics and nitrogenase induction in Frankia sp. HFPAr13 grown in batch culture*. *Plant and Soil*, 78, 61-78.
 - (20) LECHEVALIER M.P. and RUAN J.S. (1984) — *Physiology and chemical diversity of Frankia spp. isolated from nodules of Comptonia peregrina (L.) Coult. and Ceanothus americanus L.* *Plant and Soil*, 78, 15-22.
 - (21) MARGHERI M.C., TREDICI M.R., FLORENZANO G. (1983) — *Isolamento e coltura dell'endofita del genere Frankia da noduli radicali di Alnus cordata in Italia*. *Ann. Microbiol.*, 33, 137-148.
 - (22) PERINET P. and LALONDE M. (1983) — *Axenic nodulation of in vitro propagated Alnus glutinosa plantlets by Frankia strains*. *Can. J. Bot.* 61, 2883-2888.



CO-COLTURA DI **CELLULOMONAS-AZOSPIRILLUM**

E. CRESTA, F. FAVILLI

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica - Università, Firenze.

RIASSUNTO

Da una popolazione microbica mista, proveniente da letame, che si è dimostrata capace di crescere in microaerofilia su cellulosa come unica fonte di carbonio e N₂ molecolare come unica fonte di azoto, sono state isolate le componenti microbiche cellulolitica ed azotofissatrice.

Cellulomonas flavigena è stata l'unica specie batterica cellulolitica ritrovata ed *Azospirillum sp.* il più importante, per numero ed attività, microrganismo azotofissatore.

Le prove di co-coltura di questi due ceppi puri, realizzate nelle stesse condizioni sopra descritte, dimostrano che *Azospirillum spp.* è in grado di crescere e fissare attivamente N₂ molecolare (tra 64 e 220 nmole di C₂H₂ ridotti·giorno⁻¹·ml⁻¹) utilizzando i prodotti della degradazione della cellulosa rilasciati dall'attività metabolica di *Cellulomonas flavigena*.

Questi risultati indicano che l'associazione tra *Cellulomonas flavigena* ed *Azospirillum spp.* possiede una notevole compatibilità ed appare particolarmente interessante nella prospettiva di mettere a punto un processo biotecnologico di produzione di un materiale ricco in azoto organico e biomassa microbica, utilizzabile come fertilizzante organico o, eventualmente, come mangime zootecnico, partendo da residui vegetali ricchi in cellulosa ed N₂ atmosferico come sole materie prime.

SUMMARY

Microbial communities involved in both cellulolysis and nitrogen fixation were isolated from farm yard manure. Main cellulolytic activity and nitrogen fixation are attributed to the species of *Cellulomonas flavigena* and *Azospirillum sp.*

The co-culture of both microorganisms carried out in microaerophilic conditions shows that *Azospirillum* nitrogen fixation is sustained by metabolic products of *Cellulomonas flavigena* cellulolytic activity.

The association between *Cellulomonas flavigena* and *Azospirillum sp.* is highly compatible and it could be used to realise, with cellulolytic material and atmospheric nitrogen as C and N sources, a biotechnological process to produce a high nitrogen content and microbial biomass substance to use as biofertilizer or cattle food.

Introduzione

I residui cellulosici costituiscono in natura il più importante apporto di materia organica per l'ecosistema suolo.

Questo materiale possiede una composizione chimica con un rapporto carbonio/azoto assai elevato e quindi la sua degradazione ecologica richiede un apporto di N- assimilabile che viene sottratto dall'ambiente circostante; nel caso di un terreno agrario questo circostanziale depauperamento nel tenore di azoto disponibile per le piante può influire negativamente sulla coltura in corso.

Per queste ragioni può risultare non conveniente l'apporto al suolo di residui vegetali ad elevato contenuto di carbonio. La possibilità di sfruttamento agricolo di un materiale ricco in cellulosa, come i sottoprodotti agricoli (paglie, stocchi di mais e residui vegetali di varia natura), deve prima di tutto soddisfare l'esigenza di bilanciare il rapporto C/N aumentando la disponibilità di azoto in modo da assicurare la degradazione microbica della cellulosa senza diminuzione delle riserve azotate del suolo.

Ciò può essere reso possibile sfruttando le associazioni tra microrganismi cellulolitici ed azotofissatori presenti in molti ecosistemi naturali.

In diversi substrati naturali particolarmente ricchi in cellulosa (paglia, terreno con lettiera, effluenti di cartiera, letame e compost) è stata osservata la presenza di comunità microbiche dotate di attività cellulolitica ed azotofissatrice [4, 5, 7, 8, 9, 11].

Queste associazioni microbiche (funghi, batteri aerobi ed anaerobi) sembrano in grado, mediante un rapporto di sinergismo, di assicurarsi una relativa interdipendenza per quanto riguarda la disponibilità di carbonio e di azoto assimilabili, (Fig. 1) e di contribuire a rendere il materiale originale più facilmente degradabile creando altresì un substrato ricco in carbonio ed azoto assimilabile da utilizzare come biofertilizzante in agricoltura. Partendo da queste premesse gli obbiettivi della seguente ricerca possono essere così schematizzati:

a) caratterizzare le componenti microbiche cellulolitiche ed azotofissatrici presenti in una popolazione mista naturale capace di crescere e svilupparsi utilizzando cellulosa ed azoto atmosferico come uniche fonti di carbonio ed azoto;

b) ricombinare questi componenti per individuare un'associazione compatibile e capace di svolgere attivamente le due attività in modo da ottenere una conoscenza più approfondita sul processo di cellulolisi ed azotofissazione in queste condizioni;

c) mettere a punto un processo biotecnologico di trasformazione della cellulosa in materiale da usare come fertilizzante organico di alto valore agronomico, o come mangime zootecnico.

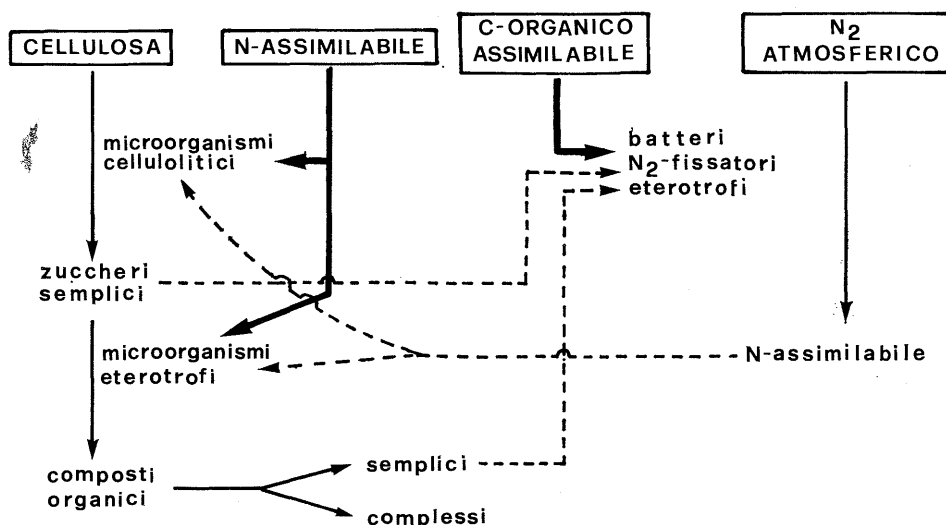


Fig. 1. — Interdipendenza tra cellulolisi ed azotofissazione. (L'interdipendenza tra i due processi è indicata dalla linea tratteggiata).

Sviluppo, isolamento e caratterizzazione di una popolazione microbica mista cellulolitica ed azotofissatrice.

Per ottenere lo sviluppo di microrganismi cellulolitici ed azotofissatori si è ricorso alla tecnica di arricchimento. Partendo da un campione di letame fresco, inoculato in un mezzo minerale contenente cellulosa come sola sorgente di carbonio ed integrato con estratto di lievito (20 mg.l⁻¹) e NH₄ Cl (500 mg.l⁻¹). Il mezzo di arricchimento è stato inoculato in condizioni di aerobiosi e di microaerofilia (pO₂ = 0,005).

Dopo una serie di passaggi successivi le popolazioni sviluppate (aerobica e microaerofila) sono state trasferite su un mezzo con la stessa composizione del precedente ma privo di azoto. Come si osserva nella figura 2 solo la popolazione microaerofila è stata in grado di ridurre attivamente l'N₂ molecolare (720 n moli di C₂ H₂·giorno⁻¹·ml⁻¹ durante la 5^a settimana) e quindi di crescere nelle condizioni descritte.

Da questa coltura di arricchimento si è proceduto all'isolamento dei componenti della popolazione microbica.

Cellulomonas spp. ed *Azospirillum* sp. sono risultate due specie, cellulolitica ed azotofissatrice, dominanti nella coltura di arricchimento, che sono state isolate e caratterizzate.

I batteri riferibili a *Cellulomonas* sono bastoncini irregolari, dritti, sin-

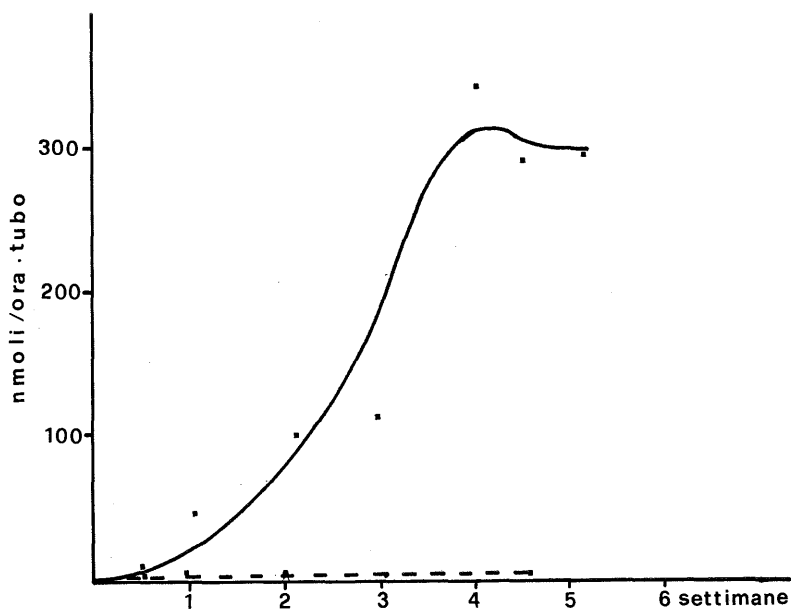


Fig. 2. — Attività nitrogenasica¹ della coltura mista in microaerofilia² (—) in aerobiosi (---) su cellulosa senza NH_4^+ .

goli o riuniti a due con formazioni a V, gram positivi e negativi mescolati, non sporigeni, dimensioni comprese tra 1-2 μm di lunghezza e 0,5 μm di larghezza.

Su mezzo di coltura agarizzato formano colonie color giallo intenso, senza diffusione del pigmento nel mezzo circostante. Utilizzano cellulosa e glucosio come sorgenti di carbonio, formando acidi organici sia in condizioni di aerobiosi che di anaerobiosi; presentano catalasi ed ossidasi positiva, utilizzano azoto sotto forma ammoniacale.

Per queste caratteristiche possono essere riferiti sistematicamente molto vicino alla specie *Cellulomonas flavigena*.

I batteri riferibili ad *Azospirillum* hanno cellule a forma elicoidale, mobili, con granuli rifrangenti all'interno, gram negativi, dimensioni intorno a 4 μm di lunghezza e 1 μm di larghezza. Su mezzo alcalino le cellule mostrano un accentuato pleomorfismo con forme allungate e mobili.

Utilizzano acidi organici (malico e succinico) come sorgenti di carbonio, non crescono su glucosio ne su cellulosa, riducono i nitrati a NO_2 ed a N_2O (nir_+).

Questi batteri presentano caratteri intermedi tra le specie *Azospirillum lipoferum* ed *Azospirillum brasilense* [1]. Batteri riferibili ad *Azospirillum*

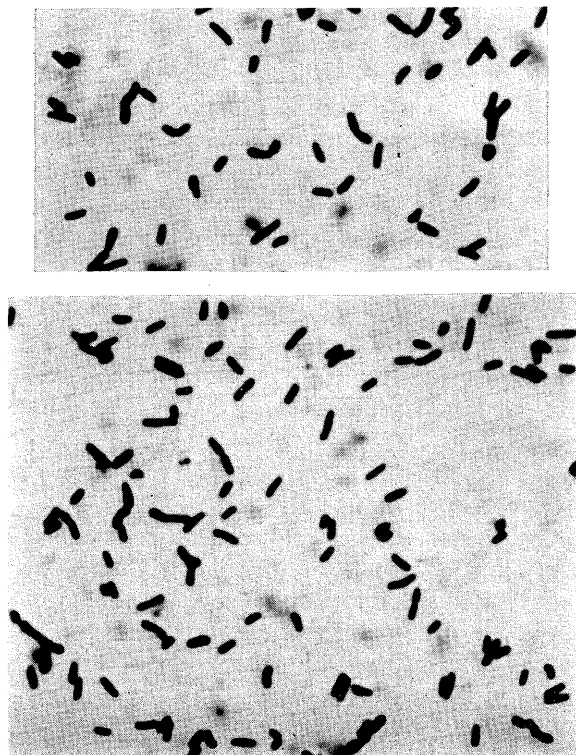


Fig. 3. — *Cellulomonas flavigena*: coltura pura su cellulosa (MCN₊). Ingrandimento x 1000. Preparato colorato con fucsina basica.

con caratteri simili a quelli da noi rilevati sono stati isolati da WONG ed al. (1980) [11] da una coltura mista di cellulolitici ed azotofissatori su paglia.

Co-coltura di Cellulomonas-Azospirillum

Tra le caratteristiche di questi microrganismi si evidenziano due importanti aspetti di compatibilità, nella prospettiva di formare un'efficiente associazione cellulolitica ed azotofissatrice:

1) Comportamento relativo alla P_{O_2} : la microaerofilia è una tra le proprietà che permettono la piena compatibilità per questi due microrganismi. Ciò è stato segnalato anche da altri autori in ricerche precedenti, nelle quali

è stata considerata esclusivamente l'attività azotofissatrice dei batteri anaerobi del genere *Clostridium*;

2) Compatibilità nutrizionale: l'idrolisi enzimatica della cellulosa effettuata da *Cellulomonas flavigena* porta alla formazione di cellobiosio e, successivamente di acidi organici. Questi ultimi prodotti costituiscono la sorgente di carbonio per il ceppo di *Azospirillum* LT1, essendo incapace di degradare la cellulosa e di utilizzare il cellobiosio non entra in competizione nutritiva con *Cellulomonas* ma elimina invece i prodotti finali della cellulolisi.

Per valutare sperimentalmente le caratteristiche dell'associazione tra *Cellulomonas flavigena* ed *Azospirillum* LT1 sono state allestite alcune prove di co-coltura utilizzando inizialmente piccoli dispositivi chiusi con tappo a vite e membrana di silicone, contenenti 10 cc di mezzo minerale con cellulosa come unica sorgente di carbonio, addizionato di 20 mg/l di estratto di lievito e senza azoto minerale.

I dispositivi inoculati con i due ceppi microbici sono stati incubati a 34°C, in microaerofilia ($PO_2 = 0,005$).

L'attività nitrogenasica della co-coltura, determinata dopo 7 giorni è stata elevata con valori compresi tra 45 e 230 nmoli·giorno⁻¹·ml⁻¹. Successivamente allo scopo di acquisire informazioni sulla possibilità di portare questo processo su scala applicativa, sono stati preparati dei reattori pilota di 300cc di volume contenenti 150 cc del mezzo indicato. L'inoculazione è stata fatta con 3 cc di una coltura in fase esponenziale di *Cellulomonas flavigena* (intorno a $5 \cdot 10^8$ cellule/ml), con 0,1 ml di una coltura di 48h (concentrazione intorno alle 10^8 cellule/ml) di *Azospirillum* LT1. La co-coltura è stata incubata a 34°C, in condizioni di microaerofilia e sottoposta all'agitazione magnetica discontinua (2 ore·giorno⁻¹). Dopo un primo periodo di 10 giorni nel quale si sono registrati valori molto bassi di attività nitrogenasica, questa si è stabilizzata tra 64 e 220 nmole·giorno⁻¹·ml⁻¹ per almeno 4 giorni. Le osservazioni microscopiche hanno dimostrato un forte incremento di ambedue i microrganismi che hanno raggiunto dopo 15 giorni una concentrazione approssimata di cellule/ml di 5×10^7 per *Azospirillum* e 2×10^8 per *Cellulomonas*. Questi risultati dimostrano che *Azospirillum* LT1 è in grado di crescere e di fissare attivamente N₂ molecolare a spese dei prodotti di degradazione della cellulosa mettendo contemporaneamente a disposizione di *Cellulomonas* azoto assimilabile in modo che l'attività cellulolitica non si arresti per carenza azotata.

Conclusioni e prospettive

I valori di attività nitrogenasica registrati dalla popolazione mista cellulolitica ed azotofissatrice iniziale (circa 300 nmole di C₂H₂ ridotti ·h⁻¹·tubo⁻¹

nella 5^a settimana di coltura, Fig. 2) sono particolarmente elevati e sono una precisa indicazione dell'intesa attività enzimatica sviluppata dai microrganismi ivi presenti.

Cellulomonas flavigena e *Azospirillum* LT1 sono i principali responsabili delle attività cellulolitica ed azotofissatrice di questa popolazione mista e la loro naturale tendenza ad associarsi cooperativamente, che trova una prima spiegazione nelle caratteristiche di compatibilità descritte, viene chiaramente dimostrata nelle prove sperimentali di co-coltura. I valori di attività nitrogenasica finora ottenuti dai nostri reattori pilota (fra 54 e 220 nmole·ml⁻¹·giorno⁻¹) sono in alcuni casi più alti e comunque dello stesso ordine di quelli riportati da J.M. LYNCH e D. VEAL (1984) [6] che, lavorando con dispositivi di dimensioni simili, ma in condizioni sperimentali diverse e inoculati con una co-coltura di *Trichoderma harzianum* e *Clostridium butyricum* hanno ottenuto una produzione media di 98 nmoli di C₂H₂ ridotti·ml⁻¹·giorno⁻¹ (1958 nmoli·ml⁻¹ in 20 giorni). La differenza a favore del sistema da noi sperimentato è che il materiale finale è ricco in una biomassa batterica di notevole interesse agronomico, dovuto alla presenza di *Azospirillum* che è un microrganismo capace di associarsi alle radici di graminacee ed altre piante non leguminose, fissando N₂ atmosferico e fornendo sostanze che stimolano lo sviluppo vegetale [2, 10].

In questo modo il prodotto finale di questo processo biotecnologico, se utilizzato come biofertilizzante fornirebbe al terreno da una parte sostanze organiche fortemente valorizzate rispetto al materiale di partenza (rapporto C/N bilanciato, polimeri parzialmente degradati e maggiore disponibilità di composti organici ed inorganici assimilabili) e dall'altra un inoculante batterico pregiato.

Le nostre ricerche prevedono attualmente due sviluppi:

1) Studio delle condizioni ottimali del rendimento del processo interdipendente di cellulolisi ed azotofissazione ad opera dell'associazione *Cellulomonas-Azospirillum*, nella prospettiva di mettere a punto un processo biotecnologico di produzione di un materiale ricco in N-organico ed in biomassa batterica utilizzabile sia come fertilizzante organico sia come mangime zootecnico partendo dai residui vegetali ricchi in cellulosa e N₂ atmosferico come uniche materie prime.

2) Studiare gli eventuali effetti sinergici sulla cinetica ed il rendimento del processo di degradazione della cellulosa, ad opera di *Cellulomonas* in presenza di un microrganismo (*Azospirillum* spp.) capace di utilizzare continuamente i prodotti finali di tale reazione enzimatica.

Infine è importante sottolineare che queste osservazioni, in accordo con quelle di WONG et al. (1979) [11] e KALINISKAYIA (1984) [3] aprono per

Azospirillum, finora studiato principalmente per la sua attività di azotofissatore rizosferico [2, 10], una nuova e promettente strada bio-tecnologica come azotofissatore libero.

BIBLIOGRAFIA

- [1] BALDANI V.L., DÖBEREINER J. (1980) — *Host-plant specificity in the infection of cereals with Azospirillum*. Soil Biol. Biochem., vol. 12, p. 433-439.
- [2] DÖBEREINER J., DAY J.M. (1976) — *Associative symbiosis and free living systems*. «Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation». - W.E. NEWTON, C.J. NUMAN eds. - p. 518-538, Washington State University Press, Pullman.
- [3] KALINISKAYA T. (1984) — *Physiological characteristics of Azospirilla isolated from soils of the Soviet Union*. «The Third International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes» - Helsinki 2-8 september 1984, poster 17.
- [4] KNOWLES R., NEUFELD R. and SIMPSON S. (1974) — *Acetylene reduction (nitrogen fixation) by pulp and mill effluents and by Klebsiella isolated from effluents and environmental situations*. Applied Microbiology, vol. 28, p. 608-613.
- [5] LYNCH J., HARPER S. (1983) — *Straw as a substrate for co-operative nitrogen fixation* Journal of General Microbiology, vol. 129, p. 251-253.
- [6] LYNCH J., VEAL D. (1984) — *Associative cellulolysis and dinitrogen fixation by co-cultures of Trichoderma harzianum and Clostridium butyricum*. Nature, vol. 310, p. 695.
- [7] NEILSON A.N., SPARREL L. (1976) — *Acetylene reduction (nitrogen fixation) by Enterobacteriaceae isolated from paper mill process waters*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 32, p. 197-205.
- [8] RICE W.A., PAUL E.A. and WETTER L.R. (1967) — *The role of anaerobiosis in asymbiotic nitrogen fixation*. Ann. Rev. of Microbiology, 34, 183-207.
- [9] RICE W.A., PAUL E.A. (1972) — *The organisms and biological processes involved in asymbiotic nitrogen fixation in waterlogged soil amended with straw*. Canadian Journal of Microbiology, vol. 18, pp. 715-783.
- [10] VAN BERKUM, BOHLOOL B.B. (1980) — *Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses*. Microbiological Reviews, vol. 44, p. 491.
- [11] WONG P.P., STENBERG N.E., EDGAR L. (1980) — *Characterization of a bacterium of the genus Azospirillum from cellulolytic nitrogen fixing mixed cultures*. Canadian Journal of Microbiology, vol. 26, p. 291.

PRODUZIONE DI INOCULO MICORRIZICO E SUA UTILIZZAZIONE

MANUELA GIOVANNETTI

Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo - C.N.R., Pisa.

RIASSUNTO

Le micorrize vescicolari-arbuscolari (VA) sono molto diffuse in natura, hanno una grande importanza nella nutrizione delle piante e possono essere utilizzate come « fertilizzanti biologici » per ridurre il consumo dei concimi chimici. Attualmente esse sono utilizzate in colture speciali come quelle vivaistiche e di serra o in situazioni ambientali particolari come i terreni erosi e marginali.

La produzione commerciale di inoculo è in via di sperimentazione in varie parti del mondo, ma poichè i funghi agenti delle simbiosi micorriziche VA sono biotrofi obbligati, l'unico modo per produrlo è quello di far crescere tali funghi nelle radici delle piante ospiti adatte. L'inoculo così prodotto è costituito dal terreno di crescita, dove si trovano ife e spore del fungo micorrizico e le radici delle piante ospiti.

La maggior parte dei tentativi di utilizzazione delle micorrize su vasta scala prevede l'inoculo e l'infezione micorrizica in piantine che sono successivamente trapiantate in campo.

Per quanto riguarda l'inoculo diretto nel terreno, sono stati sperimentati diversi metodi, sempre però su piccoli appezzamenti.

La possibilità di utilizzare su vasta scala i funghi micorrizici VA dipende molto dalle selezioni dei ceppi fungini altamente infettivi ed efficienti.

SUMMARY

Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi have not yet been grown in vitro. The only method to produce mycorrhizal inoculum is now represented by the establishment of pot-cultures. In this report the possibility of producing inoculum and the utilization of mycorrhizal fungi in agriculture are discussed.

INTRODUZIONE

Le radici della maggior parte delle piante formano simbiosi micorriziche di qualche tipo con funghi del terreno.

Sebbene siano molto diffuse sia in ecosistemi naturali che nelle colture agrarie, le simbiosi micorriziche sono state finora pressochè ignorate, ad eccezione di quelle forestali.

Le micorrize vescicolo-arbuscolari sono presenti in quasi tutte le piante agrarie più importanti, sia erbacee che arboree e l'attuale grande interesse che suscitano è dovuto al fatto che esse hanno una grande importanza nell'assorbimento del fosforo da parte delle piante e che il costo dei fertilizzanti fosfatici, in continuo aumento, ha portato alla ricerca di possibili strade per ridurre il consumo.

Il fatto saliente della simbiosi micorrizica VA è la presenza nella corteccia radicale delle piante di *arbuscoli* e di *vescicole* da cui la simbiosi prende il nome.

Gli arbuscoli sono formazioni che si trovano all'interno della cellula dell'ospite e che sono formate dalla ramificazione di un'ifa penetrata nella cellula ed in questa sede avvengono gli scambi nutrizionali tra pianta e fungo: per questo fatto gli arbuscoli hanno una posizione di fondamentale importanza nell'ambito della simbiosi.

Le vescicole rappresentano l'altra caratteristica struttura delle micorrize VA, ma non sempre sono presenti. Esse sono corpi sferoidali piuttosto grandi (50-100 μm di diametro), contenenti lipidi e che funzionano come organi di riserva. Durante lo sviluppo di arbuscoli e vescicole si accresce anche una estesa rete miceliare esterna alla radice che può espandersi anche a notevole distanza. Il micelio esterno che rappresenta circa l'1-5% del peso delle radici (MOSSE, 1956) ha un'importante funzione nell'ambito della simbiosi in quanto funziona da organo assorbente supplementare della radice della pianta, che così aumenta notevolmente la quantità di terreno esplorata.

Tale micelio può anche avvolgere la radice, ma non forma mai come nelle ectomicorrize un mantello di ife strettamente intrecciate: l'assenza di strutture macroscopiche visibili è infatti una caratteristica delle micorrize VA.

Dal micelio esterno originano spore che possono essere isolate o riunite in sporocarpi a seconda della specie fungina micorrizogena: tali spore costituiscono delle strutture di sopravvivenza e di infezione. È stato infatti dimostrato che le spore possono rimanere vitali nel terreno per mesi ed addirittura per anni (HAYMAN, 1975). Esse sono la principale fonte di infezione, ma non l'unica: possono assolvere questa funzione anche le ife del micelio esterno e le stesse radici infette (HAYMAN, 1982). Le ife preesistenti o sviluppatasi in seguito alla germinazione delle spore, quando entrano in contatto con le radici dell'ospite, generalmente formano un appressorio che costituisce un punto di entrata.

Le micorrize VA sono causate da funghi appartenenti alla famiglia delle *Endogonaceae* e sono tra quelli più comuni del terreno. Essi possiedono un micelio non settato costituito da ife di notevole diametro (8-20 μm) e producono spore globose, molto grandi (100-600 μm di diametro), riunite in alcune specie in sporocarpi. Fino al 1974 tutte le specie micorrizogene erano

assegnate al genere *Endogone* che costituiva in tal modo una unità sistematica contenente un gran numero di forme assai diverse e variabili. In seguito alla revisione proposta da GERDEMAN e TRAPPE (1974), si riconoscono quattro generi agenti di micorrize VA (*Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* e *Scerocystis*) e altri tra i quali non sono note le relazioni micorriziche (*Modicella* e *Glaziella*) o, se presenti, sono di tipo ectotrofico (*Indogone*).

Se si tiene conto di tutti i tipi di micorrize si può dire che la condizione normale delle piante terrestri provviste di radici sia quella micorrizica. Anzi è stato ipotizzato che la micorrizia sia stata un fattore determinante per il fortunato esito della colonizzazione delle terre emerse da parte dei vegetali (PIROZYNSKI e MALLOCH, 1975). Il ruolo sostenuto dalle micorrize VA è stato certamente di primaria importanza, considerando che le piante che possono ospitare nelle radici i funghi agenti di micorrize VA sono numerosissime e appartengono ai più diversi gruppi tassonomici, dalle Briofite alle Angiosperme. Solo pochi gruppi di piante sono immuni da qualsiasi tipo di micorrize e tra questi possiamo citare alcuni famiglie di Angiosperme come le *Crucifereae* e le *Chenopodiaceae* (GERDEMANN, 1975).

Conseguenza del gran numero di ospiti è la diffusione delle micorrize VA nei più disparati ambienti. Esse sono state trovate a tutte le latitudini, sia nelle regioni artiche sia in quelle temperate e tropicali. In queste ultime zone esse predominano anche tra le essenze forestali mentre negli ambienti più freddi le specie arboree sono prevalentemente ectomicorrizate. Anche in habitat come le savane, le dune sabbiose, le praterie, la presenza di micorrize VA è più o meno elevata e dipende soprattutto dal livello della fertilità del terreno.

Le dimensioni della popolazione fungina micorrizica nel terreno sono molto variabili. Il parametro più utilizzato per valutare quantitativamente tale popolazione è stato finora il numero delle spore: esso è influenzato nei terreni agrari dalle pratiche agronomiche come le rotazioni colturali, i trattamenti fertilizzanti e pesticidi.

EFFETTI DELLE MICORRIZE VA SULLA CRESCITA DELLE PIANTE

Le micorrize VA hanno evidenti effetti positivi sulla crescita delle piante. Questo fenomeno si verifica in seguito all'aumento dell'assorbimento del fosforo, operato dalle micorrize, che favoriscono anche l'assorbimento di altri ioni poco mobili come lo zinco (SANDERS e TINKER, 1973; GILMORE, 1971).

Numerose prove dimostrano che il fungo permette alla pianta di avere un apporto supplementare di fosforo e che un'adeguata concimazione fosfatica

equivale nei suoi effetti all'infezione micorrizica (ABBOTT e ROBSON, 1977). Anzi, quando il livello di fosforo nel terreno non è tale da limitare la crescita ottimale della pianta, solitamente le micorrize non danno alcun beneficio, mentre danno i più grandi incrementi in crescita in terreni a basso contenuto di fosfati assimilabili (MENGE *et al.*, 1978).

In questi terreni la concentrazione del fosfato nella soluzione circolante è di solito molto bassa (1-2 ppm); inoltre gli ioni fosfato si muovono molto lentamente e intorno alle radici delle piante si forma una zona di esaurimento di fosforo dovuta al rapido assorbimento di essi da parte della pianta, che non sono rimpiazzati da una quantità equivalente proveniente dal terreno circostante. Tale zona può arrivare a misurare anche 1 mm (TINKER, 1975).

Quando le radici sono micorrizzate, si sviluppa una densa rete miceliare esterna, che si estende molto al di là della zona di esaurimento suddetta e che esplora un volume di terreno molto grande, assorbendo ioni fosfato non altrimenti raggiungibili dalle radici delle piante se non a prezzo di maggiori dispendi energetici.

Il fosfato assorbito dal micelio esterno viene traslocato, sotto forma di granuli di polifosfato e per mezzo delle correnti citoplasmiche, al micelio interno e da qui, tramite gli arbuscoli, alla pianta ospite (PEARSON e TINKER, 1975; COX *et al.*, 1975; GIANINAZZI e GIANINAZZI - PEARSON, 1979).

APPLICAZIONI PRATICHE DELLE MICORRIZE

Le micorrize VA incrementano l'assorbimento di fosforo e altri ioni e possono essere considerate veri e propri « fertilizzanti biologici ». Il principale ostacolo alla loro estesa applicazione in agricoltura risiede nel fatto che i funghi agenti di tale simbiosi sono tuttora considerati biotrofi obbligati, non possono cioè vivere riprodursi al di fuori di piante viventi. Per questo motivo è difficile ipotizzare un inoculo massivo in colture estensive, data la qualità enorme di inoculo richiesto e la difficoltà a produrlo, mentre il loro uso è probabilmente più attuabile ed economicamente conveniente in colture agrarie speciali come quelle vivaistiche e di serra e in condizioni ambientali particolari come i terreni marginali da recuperare all'agricoltura (MOSSE, 1981).

Per quanto riguarda le colture di vivaio, da molti anni è stato riconosciuto che l'arresto di crescita delle colture successivo alle fumigazioni è dovuto alla distruzione dei funghi micorrizici operata dai biocidi utilizzati (KLEINSCHIMDT e GERDEMANN, 1972). Particolarmente tossici sono cloropirina e bromuro di metile, che peraltro sono normalmente usati nelle colture vivaistiche per eliminare semi infestanti, insetti, nematodi e funghi patogeni del terreno. Tale fenomeno è stato descritto per un certo numero di piante,

tra cui avocado, agrumi, cotone, pesco, piante da legno (MENGE, 1983). L'inoculo con funghi micorrizici in terreni fumigati si è sempre rivelato efficace nell'eliminare il fenomeno della crescita stentata e di ridurre il fabbisogno di fertilizzanti.

Sulla base di quanto sopra esposto si può ipotizzare che anche le piante riprodotte per propagazione meristemica, sia erbacee che arboree, potranno avvantaggiarsi dell'inoculo micorrizico, specie quelle che si sono dimostrate più dipendenti dalle micorrize come il pesco.

L'inoculo con funghi micorrizici in terreni fumigati è necessario in molti casi perchè le piante raggiungano una crescita ottimale: un esempio di ciò si ha in molti vivai della California, dove la fumigazione con bromuro di metile è una pratica abituale e in cui piante di agrumi e avocado vengono attualmente inoculate con funghi micorrizici (JOHNSON e MENGE, 1982).

Le colture di serra non crescono in condizioni molto diverse, se si tiene conto che spesso i substrati colturali sono costituiti da perlite, vermiculite, torba, sabbia e vari mezzi sintetici, comunque tutti privi di endofiti micorrizici. Inoltre, spesso tali substrati vengono anche pastorizzati o sterilizzati per eliminare pericolosi patogeni. In questi casi non si hanno normalmente fenomeni di arresto di crescita, e clorosi, dati gli enormi quantitativi di fertilizzanti usati, ma in esperimenti eseguiti su piante ornamentali come *Viburnum*, *Podocarpus*, *Pittosporum*, *Magnolia*, *Petunia*, l'inoculo micorrizico dava responsi positivi di crescita e permetteva un risparmio in fertilizzanti pari al 70% (MENGE, 1983).

Nelle aree marginali da recuperare all'agricoltura è stato dimostrato che le micorrize VA aiutano la colonizzazione, da parte delle piante, di zone di scarico di residui di miniere e di rifiuti urbani (DAFT e NICOLSON, 1974; DAFT e HACSKEYLO, 1976). Infatti in tali ambienti la popolazione di funghi micorrizici è molto bassa e l'inoculo fornisce anche una certa resistenza ai metalli pesanti ed alle alte temperature.

Aree diverse, ma non meno peculiari, sono costituite da dune sabbiose alla cui colonizzazione da parte delle piante le micorrize VA contribuiscono in modo notevole. L'uso di piante micorrizzate si è dimostrato un fattore molto importante in programmi di stabilizzazione delle dune e di controllo dell'erosione.

PRODUZIONE DELL'INOCULO MICORRIZICO

Il primo passo di ogni ricerca o programma teso ad utilizzare le micorrize VA è l'allestimento di una collezione di endofiti infettivi ed efficienti. Questa è ben diversa da qualsiasi collezione micologica poichè i funghi micorrizici

sono biotrofi obbligati. La collezione perciò sarà costituita da piante in vaso, nelle cui radici vivono in simbiosi endofiti micorrizici diversi. Una collezione rappresentativa dovrebbe essere costituita da endofiti isolati in loco, con l'aggiunta di qualche endofita in larga utilizzazione in tutto il mondo.

La raccolta deve essere eseguita su piante sicuramente micorriziche, evitando le specie immuni e quelle sporadicamente micorrizzate. Il metodo più sicuro per isolare endofiti in purezza è la raccolta delle spore, eseguita con il metodo generalmente conosciuto come « wet sieving and decanting » (GERDEMANN e NICOLSON, 1963). Si prelevano circa 100 g di terreno molto vicino alle radici, lavandolo molte volte in acqua e filtrando l'acqua di lavaggio attraverso setacci a maglie di 750, 250 e 100 μm di diametro; la frazione organica ritenuta sui setacci viene risospesa in acqua, posta su piastre petri ed esaminata al microscopio stereoscopico per la raccolta delle spore. Tali spore devono essere successivamente osservate ad un microscopio ad alto ingrandimento per la loro identificazione tassonomica, che può essere effettuata seguendo una delle classificazioni più usate, come quella di HALL e FISH (1979), GERDEMANN e TRAPPE (1974), TRAPPE (1982).

Una volta identificate, le spore devono essere coltivate in colture in vaso in terreno sterile. Una delle tecniche più seguite è quella di porre 10 o 20 spore in circa 1 cm^2 di carta finissima e circondare le radici di una piantina sterile con alcuni di questi inoculi. Dopo 3 o 4 mesi si avrà una produzione di migliaia di spore, con cui continuare le colture stock (HAYMAN, 1982).

Un'altra tecnica è quella di porre nella buca di trapianto una piccola quantità di terreno e radici provenienti da una pianta ben infettata.

Infine, per raccogliere e riprodurre endofiti dal terreno si possono usare delle piante-trappola, facendo germinare e crescere una piantina in terreno non sterile, tanto a lungo quanto basta perchè sia infettata da endofiti naturali. Essa viene poi rimossa, l'apparato radicale lavato e successivamente trapiantata in terreno sterile dove l'infezione progredirà e si produrranno spore da mettere in collezione. Con questo metodo però non siamo sicuri della assoluta purezza dell'inoculo prodotto, poichè diversi propaguli fungini possono avere infettato nel medesimo tempo la piantina. Sarà necessario quindi eseguire un secondo controllo ed una eventuale selezione delle spore prodotte (HAYMAN, 1982).

Mantenimento delle piante-stock

Una volta stabilite le colture in vaso di ogni singolo endofita, si possono usare le spore ottenute per produrre quantità illimitate di piante stock da utilizzare come inoculo. È necessario tuttavia controllare periodicamente se ci siano inquinamenti. Questi possono essere dovuti a parassiti dell'endofita in coltura, ad altri endofiti o a patogeni delle piante da inoculare. In ognuno

di questi casi è necessario stabilire nuove piante stock raccogliendo le spore e sterilizzandole in superficie, prima di reintrodurle in un terreno sano (MENGE, 1983). Le specie di piante più adatte per il mantenimento delle colture sono quelle perenni e non troppo grandi come cipolla, sorgo, fragola; la cosa più importante da considerare al fine di evitare contaminazioni è quella di utilizzare piante stock che non abbiano patogeni in comune con quelle da inoculare.

Per quanto riguarda i terreni, essi debbono essere selezionati in base alla loro struttura fisica (terreni sabbiosi sono i migliori), alla fertilità, che non deve essere alta, come del resto il contenuto in fosforo.

Anche la preferenza di alcuni endofiti per il pH del terreno deve essere presa in considerazione.

Poichè i terreni prescelti devono essere sterilizzati, ma solo parzialmente, quanto basta per eliminare gli endofiti micorrizici, si usa la irradiazione con raggi gamma (0.8-1 Mrad), o la vaporizzazione di esso per un'ora.

Il numero di spore raccolte è massimo il primo anno e diminuisce molto dopo due o tre anni, perciò è consigliabile rinnovare almeno ogni due anni le piante stock.

METODI PER LA PREPARAZIONE E LA DISTRIBUZIONE DELL'INOCULO IN CAMPO

Le tecniche per introdurre l'inoculo micorrizico VA nelle colture differiscono a seconda che le piante siano coltivate in colture estensive come grano, mais, soia, oppure siano prima allevate in vivaio e dopo singolarmente trapiantate come caffè, agrumi, fragole. Naturalmente l'inoculo del secondo tipo di piante presenta molti meno problemi ed è quello che attualmente viene praticato in alcuni vivai.

Di seguito vengono elencate le principali tecniche in uso.

1) *Preinoculo delle piante*

Questo è il miglior metodo per stabilire l'infezione in piantine che normalmente sono trapiantate in campo. In questo modo inoltre è possibile avere forti infezioni nelle piante di endofiti selezionati prima di trapiantarle in terreni contenenti endofiti naturali di dubbia infettività e sconosciuta efficienza. Su scala pratica questo tipo di inoculo può avere utili applicazioni in molte piante agricole tropicali come caffè, tè, cacao, papaia, oltre che nelle piante coltivate in vivaio già ricordate, e piante come il *L. styraciflua* e *L. tulipifera*, altamente micorrizza-dipendenti (KORMANIK *et al.* 1979).

2) *Inoculo di terreno infetto nel solco di semina*

L'inoculo è costituito in questo caso da terreno proveniente da colture stock. Tale inoculo contiene spore, ife e pezzi di radice infetti e ha dato risultati positivi sia in terreni fumigati sia in parcelle di terreno naturale. L'unico inconveniente di questo tipo di inoculo risiede nel fatto che essendo usato terreno come tale, ne sono necessarie da 2 a 3 t per ha. Tali quantità sono ovviamente impossibili da produrre in vaso e di difficile applicazione su vasta scala (CLARKE e MOSSE, 1981).

3) *Inoculo fluido*

Un liquido viscoso (4% metilcellulosa) contenente semi germinati e inoculo è immesso nel solco di semina. Questo metodo ha dato risultati molto positivi in colture di trifoglio rosso. L'inoculo in questo caso è costituito dalla frazione organica del terreno infetto originale, concentrata attraverso la filtrazione, ed è quindi facilmente maneggiabile. Una possibilità offerta da questo metodo è quella di permettere anche l'introduzione di ceppi selezionati di *Rhizobium* in tale fluido (HAYMAN *et al.*, 1981).

4) *Inoculo del seme*

In questo caso l'inoculo è fissato su semi singoli per mezzo di adesivi come la metilcellulosa. Tale metodo, però, presenta due svantaggi. Il primo è che i propaguli fungini sono piuttosto grossi perchè possano adeguatamente aderire a semi piccoli (HATTINGH e GERDEMANN, 1975). L'altro svantaggio è che l'inoculo fungino è relativamente poco mobile e può rimanere attaccato all'involucro esterno del seme e muoversi poco anche nell'acqua di drenaggio senza riuscire a raggiungere le radici.

5) *Inoculo in pellets*

Viene usato materiale di supporto come lignite o terreno argilloso e in questo vengono mescolati semi e inoculo micorrizico. Tali pellets non possono però essere incorporati troppo profondamente nel terreno, per permettere la germinazione del seme; perciò si ha l'inconveniente precedentemente descritto dell'immobilità dell'inoculo rispetto alle radici (POWELL, 1979).

6) *Terreno altamente infettivo*

Il potenziale infettivo di un terreno può essere accresciuto in situ coltivando prima della coltura interessata una pianta ad elevato grado di micotrofia, che aumenti così la popolazione micorrizica. Il terreno così arricchito può anche essere rimosso e poi usato come tale altrove (BLACK e TINKER,

1977). Questo metodo presenta una potenzialità d'uso su larga scala. Infatti se teniamo conto della difficoltà attuale a produrre grossi quantitativi di inoculo e quindi a poter utilizzare le micorrize anche in colture estensive, una soluzione ottimale potrebbe essere rappresentata appunto da questa tecnica. Ogni azienda potrebbe avere parcelle di terreno dove vengono coltivate piante altamente micotrofiche ed il terreno così ottenuto potrebbe essere trasferito all'interno della stessa azienda, in colture micorrizza-dipendenti.

BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT L.K., ROBSON A.D. (1977) — Growth stimulation of subterranean clover with vesicular-arbuscular mycorrhizas. Aust. J. Agric. Res. 28, 639-649.
- BLACK R.B.L., TINKER P.B. (1977) — Interaction between effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and fertilizer phosphorus on yields of potatoes in the field. Nature, 267, 510-511.
- CLARKE C., MOSSE B. (1981) — Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. XII. Field inoculation responses of barley at two soil P levels. New Phytol. 87, 695-704.
- COX G., SANDERS F.E., TINKER P.B., WILD J.A. (1975) — Ultrastructural evidence relating to host endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza, in: *Endomycorrhizas*. Ed. Sanders, F.E., Mosse B., Tinker P.B., Academic Press, London, 297-312.
- DAFT M.J., NICOLSON T.H. (1974) — Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing coal-wastes in Scotland. New Phytol. 73, 1129-1138.
- DAFT M.G., HACSKAYLO E. (1976) — Arbuscular mycorrhizas in the antracite and bituminous coal wastes of Pennsylvania. J. Appl. Ecol. 13, 523-531.
- GERDEMANN J.W. (1975) — Vesicular-arbuscular mycorrhizas, in: *The development and function of roots*. Academic Press, London, 575-591.
- GERDEMANN J.W., NICOLSON T.H. (1963) — Spores of endomycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. Trans Br. Mycol. Soc. 46, 235-244.
- GERDEMANN J.W., TRAPPE J.M. (1974) — *The Endogonaceae in the Pacific Northwest*. Mycologia Memoir 5, 1-76.
- GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V. (1979) — Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). New Phytol. 82, 127-132.
- GILMORE A.E. (1971) — The influence of endotrophic mycorrhizae on the growth of peach seedlings. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96, 35-38.
- HALL I.R., FISH B.J. (1979) — A key to the Endogonaceae. Trans. Br. Mycol. Soc. 73, 261-270.
- HATTINGH M.J., GERDEMANN J.W. (1975) — Inoculation of Brazilian sour orange seed with an endomycorrhizal fungus. Phytopathol. 65, 1013-1016.
- HAYMAN D.S. (1975) — The occurrence of mycorrhiza in crops as affected by soil fertility. In: *Endomycorrhizas*. Ed. Sanders F.E., Mosse B., Tinker P.B. Academic Press London, 495-509.
- HAYMAN D.S. (1982a) — Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathol. 72, 1119-1125.

- HAYMAN D.S. (1982b) — *Practical aspects of vesicular-arbuscular mycorrhiza*, in: *Advances in agricultural microbiology*. Ed. SubbaRao N.S., Oxford e IBH Publish Co., New Delhi, 325-373.
- HAYMAN D.S., MORRIS E.J., PAGE R.J. (1981) — *Methods for inoculating field crops with mycorrhizal fungi*. *Ann. Appl. Biol.* 99, 247-254.
- JOHNSON C.R., MENGE J.A. (1982) — *Mycorrhizae may save fertilizer dollars*. *Am. Nurseryman* 155, 79-87.
- KLEINSCHIMDT G.D., GERDEMANN J.W. (1972) — *Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae*. *Phytopathol.* 62, 1447-1453.
- KORMANIK P.P., BRYAN W.C., SCHULT R.C. (1979) — *Endomycorrhizal inoculation during transplanting improves growth of vegetatively propagated yellow poplar*. *Plant Propag.* 23, 4-5.
- MENGE J.A. (1983) — *Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture*. *Can. J. Bot.* 61, 1015-1024.
- MENGE J.A., JOHNSON E.L.V., PLATT R.G. (1978) — *Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes*. *New Phytol.* 81, 553-560.
- MOSSE B. (1956) — *Studies on the endotrophic mycorrhiza of some fruit plants*. Ph. D. th., Univ. London, London.
- MOSSE B. (1981) — *Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture*. *Res. Bull.* 194, Univ. Hawaii.
- PEARSON V., TINKER P.B. (1975) — *Measurement of phosphorus fluxes in the external hyphae of endomycorrhizas*, in: *Endomycorrhizas*. Ed. Sanders F.E., Mosse B., Tinker P.B. Academic Press, London, 277-287.
- PIROZYNSKY K.A., MALLOCH D.W. (1975) — *The origin of land plants: a matter of mycotrophism*. *Bio Systems* 6, 153-164.
- POWELL C.LI. (1979) — *Inoculation of white clover and ryegrass seed with mycorrhizal fungi*. *New Phytol.* 83, 81-85.
- SANDERS F.E., TINKER P.B. (1973) — *Phosphate flow into micorrhizal roots*. *Pest. Sci.* 4, 385-395.
- TINKER P.B. (1975) — *Soil chemistry of phosphorus and mycorrhizal effects on plant growth*, in: *Endomycorrhizas*. Ed. Sanders F.E., Mosse B., Tinker P.B. Academic Press, London, 353-371.
- TRAPPE J.M. (1982) — *Synoptic keys to the genera and species of Zygomycetous mycorrhizal fungi*. *Phytopathol.* 72, 1102-1108.

EFFETTI DI QUANTITÀ CRESCENTI DI FOSFORO E DI INOCULO SULLO SVILUPPO DELLA INFEZIONE MICORRIZICA

L. AVIO e M. GIOVANNETTI

Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo - C.N.R., Pisa.

RIASSUNTO

È stata studiata l'influenza che la densità dell'inoculo fungino e la concentrazione di fosforo nel terreno hanno sul progredire dell'infezione micorrizica in piante di lupinella (*Onobrychis viciaefolia* Scop.). Per seguire lo sviluppo della simbiosi micorrizica sono stati determinati settimanalmente, dopo l'inoculo, il numero di punti di penetrazione del fungo nella radice (entry points) e la percentuale di infezione. È stato osservato che l'infezione era più precoce in presenza di quantità maggiori di inoculo: infatti nelle radici di piante trattate con più elevate dosi di inoculo gli entry points si formavano prima e in maggior numero, così come lo sviluppo del fungo all'interno delle radici era più rapido. La concentrazione di fosforo nel terreno non influiva sulla precocità di formazione degli entry points mentre aveva effetto sul loro numero. La quantità di fosforo presente nel terreno svolgeva inoltre un ruolo determinante nella regolazione dei livelli di infezione: alla concentrazione più alta di fosforo corrispondeva il valore più basso di infezione micorrizica.

SUMMARY

Increasing amounts of phosphate and of mycorrhizal inoculum were applied to the soil where sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) was grown.

The plants inoculated with the highest inoculum densities were infected earlier, while those inoculated with the lowest densities did not show infections higher than 10%. Phosphate levels in the soil did not influence the precocity of infection.

INTRODUZIONE

Gli endofiti vescicolo-arbuscolari sono presenti nei terreni agricoli in quantità e qualità diverse in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche del terreno, alla sua fertilità, al tipo di avvicendamento colturale (maggese più o meno prolungati, coltivazioni di piante non micorriziche) e ai trattamenti fitosanitari utilizzati (KRUCKELMANN, 1975; HAYMAN, 1982).

È possibile pertanto che si verifichi una situazione in cui la popolazione

endomycorrizica naturale sia scarsa e che si renda utile inoculare un endofita vescicolo-arbuscolare affinché si ottenga un grado di micorrizzazione delle piante capace di fornire positive risposte di crescita.

In questo esperimento è stato esaminato l'effetto del fosforo e di diverse quantità di inoculo micorrizico sull'andamento dell'infezione di radici di lupinella (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) per stabilire se è possibile individuare un livello critico di infezione, dopo alcune settimane dalla semina, che ci permetta di prevedere se la pianta darà risposte positive di crescita alla micorrizzazione.

MATERIALI E METODI

In tutte le prove era utilizzato terreno argilloso povero di fosforo (8 ppm Olsen) e a reazione alcalina (pH 8,4), proveniente da colline del volterrano (Pisa). Tale terreno, sterilizzato a vapore, mescolato in parti uguali con ghiaia, era posto in vasi di 14,5 cm di lato, collocati in bancali all'aperto. All'inizio della primavera era seminata la lupinella e all'emergenza le piantine venivano diradate, lasciandone 20 per vaso. Ogni trattamento, che consisteva in tre replicazioni, risultava dalla combinazione di diverse dosi di inoculo e di fosforo nel terreno (Tabella 1). L'inoculo era costituito da terreno, micelio, spore e radici infette di fragola proveniente da coltura stock di *Glomus mosseae*. A partire da una settimana dopo l'emergenza delle piantine, erano eseguiti settimanalmente prelievi per ogni tesi I₀, I₁, I₂, I₃, per determinare la quantità di infezione micorrizica presente nelle radici. Queste erano colorate secondo il metodo Phillips e Hayman (1970) e la percentuale di infezione radicale veniva determinata con il metodo « grid-line intersect » (GIOVANNETTI and MOSSE, 1980). Al termine della prova, 15 settimane dopo l'emergenza, erano determinati anche i pesi secchi del fusto delle piante.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'inoculo più ricco di propaguli fungini favoriva notevolmente la precocità dell'infezione. Alla maggior dose di inoculo somministrata si aveva, rispetto alle altre dosi di inoculo, indipendentemente dalla concentrazione di fosforo, una più precoce formazione di entry points, un più anticipato sviluppo dell'infezione radicale e l'infezione raggiungeva prima la fase stazionaria (Figg. 1, 2, 3).

Le prime osservazioni sulla presenza di entry points sono state fatte con le piante inoculate con la dose I₃ alla quarta settimana dall'emergenza ed in

quella successiva c'era almeno un entry point ogni 4 cm di apparato radicale. Invece a dosi inferiori di inoculo la formazione di entry points era molto più tardiva: alla dose di inoculo I₂ essi sono stati osservati all'ottava settimana. Come conseguenza di ciò l'infezione radicale alla dose I₃ era anticipata rispetto alle altre dosi e raggiungeva o superava il 10% già alla sesta settimana, nei tre trattamenti con diverse dosi di fosforo, e il 20% alla settimana, quando nelle altre prove le piante non erano ancora micorrizzate. Un'altra

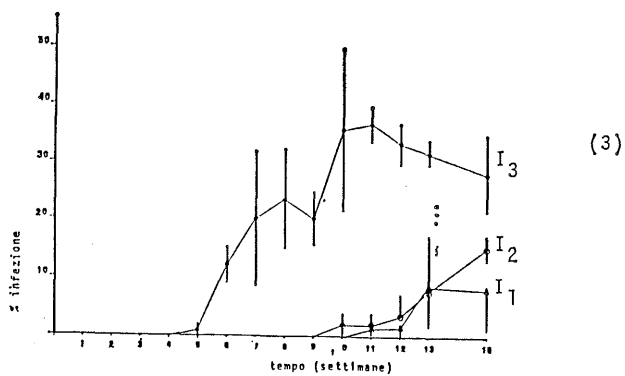
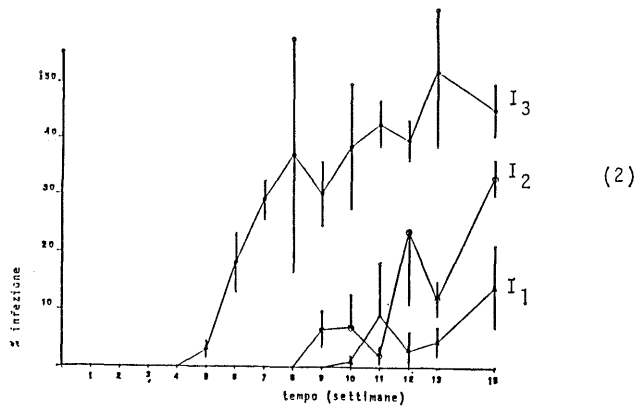
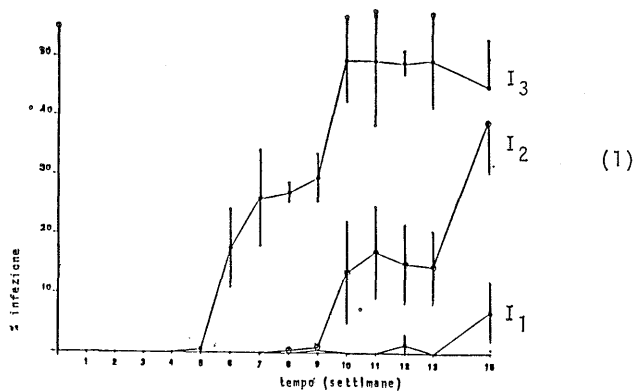
Tabella 1. — Dosi di fosforo e di inoculo micorrizico impiegate.

Trattamento		Dosi impiegate	
Fosforo	Ca (H ₂ PO ₄) ₂ (g/vaso)	P ppm	P ₂ O ₅ Kg/ha
P ₀	0	0	0
P ₁	0,37	20	100
P ₂	0,74	40	200
Inoculo	g/vaso		Kg/ha
I ₀	0		0
I ₁	0,3		150
I ₂	1,0		500
I ₃	30,0		15000

conseguenza del precoce inizio dell'infezione era che alla dose più alta di liquido essa raggiungeva alla decima settimana il livello più alto, mentre negli altri casi, alla raccolta finale, la curva dell'infezione era ancora nella fase di crescita. Anche la concentrazione di fosforo influiva sull'andamento dell'infezione. Alla dose P₀ c'era una netta differenza tra le curve dei diversi inoculi. Alle dosi P₁ e P₂ le differenze erano più evidenti tra le curve I₃ e I₂, mentre quelle tra le curve degli inoculi più ridotti tendevano a diminuire. Molto evidente era l'effetto che la dose P₂ aveva sul livello di infezione radicale alla raccolta, alle dosi di inoculo I₃ e I₂; l'infezione infatti era a I₃ del 44% e 45% a P₀ e P₁ contro il 28% a P₂ e alla dose I₂ era rispettivamente del 39%, 33% e 15%. Alla dose I₁ i valori erano del 7%, 14% e 8%.

I pesi secchi finali sono riportati nella tabella 2, unitamente alle percentuali di infezione micorrizica.

Da essa si può notare che i massimi pesi secchi sono stati ottenuti quando alle dosi più elevate di fosforo si combinavano le dosi più elevate di inoculo fungino, che corrispondevano ad alti livelli di infezione micorrizica alla raccolta. Ciò dimostra che anche nel presente esperimento la simbiosi micorrizica determina una migliore utilizzazione del fosfato aggiunto, come già visto da POWELL (1979) e MOSSE (1981). Infatti nei trattamenti I₃P₁ e I₃P₂ si sono verificati incrementi di crescita del 49% e 65% rispetto ai tratta-



Figg. 1, 2, 3. — Sviluppo dell'infezione micorrizica in piantine di lupinella a tre dosi di P nel terreno (P₀, P₁, P₂), inoculate con tre diverse densità di inoculo.

menti non micorrizzati I_0P_1 e I_0P_2 . Al contrario, quando il fosforo è presente in scarse quantità, la simbiosi micorrizica non contribuisce in modo evidente alla crescita delle piante (POWELL, 1979).

Per quanto riguarda la individuazione della quantità di infezione micorrizica necessaria e sufficiente per dare il massimo raccolto, si può dire che

Tabella 2. — Effetto della densità dell'inoculo e delle dosi di fosforo sulla crescita e l'infezione micorrizica di *O. viciaefolia*.

Trattamento	% infezione micorrizica	Peso secco fusto (g)
I_0P_0	0 a °	0,34 ab
I_1P_0	7 a	0,25 a
I_2P_0	39 cd	0,58 c
I_3P_0	44 d	0,40 b
I_0P_1	0 a	0,69 cd
I_1P_1	14 ab	0,59 c
I_2P_1	33 cd	0,83 ef
I_3P_1	45 d	1,03 gh
I_0P_2	0 a	0,69 cd
I_1P_2	8 a	0,89 fg
I_2P_2	15 ab	0,75 de
I_3P_2	28 bc	1,14 h

° Entro le colonne, i numeri seguiti dalla stessa lettera non differiscono significativamente ($p = 0,05$).

quando siamo in presenza di un terreno contenente scarse quantità di fosforo si ha un equilibrio instabile della simbiosi e non si hanno effetti notevoli di crescita dovuti ad essa.

Quando la quantità di fosforo nel terreno raggiunge 20 ppm, si può dire che se alla sesta settimana dall'emergenza le piantine presentano un'infezione radicale del 15%, sicuramente le piante trarranno il massimo beneficio dalla simbiosi micorrizica; se invece a quella data l'infezione radicale non è ancora presente, non ci saranno possibilità di avere il massimo raccolto, almeno al primo sfalcio.

In terreni contenenti quantità di fosforo intorno a 40 ppm, le piante trarranno il maggior beneficio possibile dalla simbiosi micorrizica se alla sesta settimana l'infezione è circa del 10%.

Concludendo possiamo dire che la simbiosi micorrizica ha permesso alle piante di sfruttare meglio il fertilizzante fosfatico aggiunto e che è possibile determinare un livello « critico » di infezione radicale, che fin dalla sesta settimana dopo l'emergenza permetta di stabilire se la quantità di inoculo presente nel terreno sarà sufficiente per dare il miglior raccolto.

BIBLIOGRAFIA

- GIOVANNETTI M. and MOSSE B. (1980) — *An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots*. New Phytologist, 84, 489-500.
- HAYMAN D.S. (1982) — *Practical aspects of vesicular-arbuscular mycorrhiza*, in: Advances in agricultural microbiology. Ed. SubbaRao N.S. Oxford nad IBH Publish. Co: New Dehli, 325-373.
- KRUCKELMANN G.D. (1975) — *Effects of fertilizers, soils, soil tillage and plant species on frequency of Endogone chlamydo spores and mycorrhizal infection in arable soils*, in: Endomycorrhizas. Ed. Sanders F.E., Mosse B., Tinker P.B. Academic Press, London, 511-525.
- MOSSE B. (1981) — *Vesicular-arbuscular research for tropical agriculture*. Res. Bull. 194, Univ. Hawaii.
- POWELL C. LI. (1979) — *Effect of mycorrhizal fungi on recovery of phosphate fertilizer from soil by ryegrass plants*. New Phytologist, 681-694.

LA COLTURA DI AZOLLA IN CONSOCIAZIONE CON IL RISO O IN COLTURA MASSIVA INTERCALARE

M. VINCENZINI, M.C. MARGHERI, P. CARLOZZI, B. PUSHPARAJ
G. TORZILLO, W. BALLONI

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica - Università
e Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - C.N.R. - Firenze

RIASSUNTO

Vengono riportati i progressi compiuti nella tecnica della coltura massiva di *Azolla filiculoides* che hanno consentito tra l'altro di realizzare in una vasca di 100 m² rese medie (in sostanza secca) di 11 g · m⁻² · giorno⁻¹ per un periodo di 5 mesi e con un contenuto di azoto fissato nella biomassa del 5,25%. Inoltre vengono considerate due modalità di applicazione dell'*Azolla* in risaia: consociazione con il riso, e l'introduzione nel terreno a guisa di sovescio. In consociazione al riso l'*Azolla*, che ricopre come un tappeto verde la superficie della risaia, controlla lo sviluppo delle erbe infestanti, ma non cede l'azoto fissato nel corso dello sviluppo del riso se si esclude l'apporto di alcuni complessi umo-minerali. L'effetto fertilizzante vero e proprio si consegue con l'interramento della biomassa fresca di *Azolla* prima della coltura del riso. Si tratta infatti di un materiale organico facilmente degradabile, come è stato evidenziato da recenti ricerche di Favilli et al. (1983).

SUMMARY

Recent advances in the outdoor culture technique of *Azolla filiculoides* are described. A considerable increase in biomass yield and in the amount of nitrogen fixed have been obtained (mean daily yield of 11 dry weight. sq metre⁻¹ · day over a five month period with a nitrogen content of 5.25%). When grown in consociation with rice, *Azolla* forms a green lawn that controls the growth of weeds. However only a small amount of nitrogen is made available to the chop. A rapid fertilizing effect is achieved when the *Azolla* biomass is buried in the soil just before rice cultivation, since *Azolla* biomass is rapidly decomposed in the soil, as evidenced by recent investigations by Favilli et alii (1983).

PREMESSA

Azolla, piccola felce della famiglia delle Salviniacee largamente diffusa in ambienti acquatici (canali, fossi, risaie) delle regioni tropicali e temperate, ha suscitato l'interesse sia dei botanici che degli agronomi da quando Strasburger nel 1873 riscontrò nella cavità fogliare, la presenza di un endosimbionte

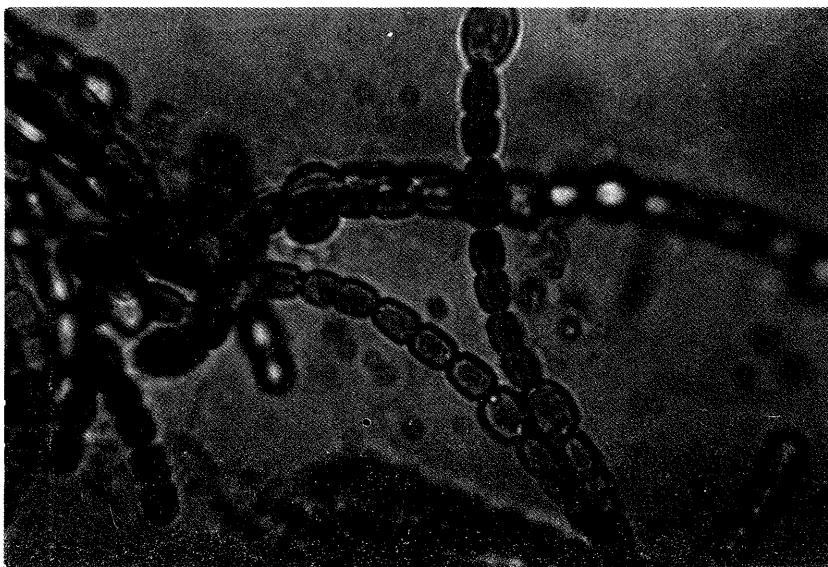


Fig. 1. — *Anabaena azollae* isolata dalla cavità fogliare di *Azolla caroliniana* (x 900).

cianobatterico: *Anabaena azollae* (Fig. 1) ritenuto da FJERDINGSTAD (1976) un ecotipo di *Anabaena variabilis*. Grazie all'attività nitrogenasica del simbiote procariota, *Azolla* è in grado di crescere molto rapidamente in assenza di azoto combinato, coprendo vaste superfici d'acqua.

Del genere *Azolla* si conoscono attualmente 6 specie divise in due sezioni: Euazolla e Rhizosperma.

Nella sezione Euazolla, sono comprese 4 specie: *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. caroliniana*, *A. microphylla* tutte distribuite nei continenti Sud e Nord Americano. L'*A. filiculoides* e l'*A. caroliniana*, sono le uniche specie che si trovano anche in Europa. *A. caroliniana* è specie considerata naturalizzata, anche in alcune nostre regioni centro-settentrionali: ambienti acquatici della Toscana, Valle Padana e Lazio (AVENA ed altri, 1974).

Alla sezione Rhizosperma appartengono 2 specie: *A. nilotica* del Nilo e Sudan e *A. pinnata* delle zone tropicali e subtropicali della Asia e Africa.

L'interesse maggiore della simbiosi *Azolla-Anabaena* risiede nell'alta capacità N₂-fissatrice che supera quella della simbiosi leguminose-*Rhizobium*. TALLEY ed altri (1977) riportano tassi di N₂-fissazione di 1-2 Kg di N₂ per ettaro giorno, DAO e TUAN (1966) rendimenti di Kg 864 di N₂ fissato · ha⁻¹ · anno⁻¹. Recenti indagini condotte nel nostro Centro da MARGHERI ed altri (1984) hanno riscontrato, su tre specie di *Azolla* (*A. pinnata*, *A. filiculoides* e

A. caroliniana) coltivate all'aperto nel periodo estivo, tassi di azotofissazione, rispettivamente di 0,47 0,51 e 0,52 m mole di N_2 per g (peso secco) e per giorno, con una produttività media di biomassa di *Azolla* (peso secco) di $10 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{g}^{-1}$.

La capacità di fissare l'azoto è stata riscontrata anche nell'endofita cianobatterico, isolato dalla felce, ma ad un tasso notevolmente più basso di quello riscontrato in simbiosi con *Azolla* (PETERS, 1975; PETERS e MAYNE, 1974; PETERS ed al., 1977; 1979). Il cianobatterio azotofissatore, isolato dall'*Azolla*, libera nel mezzo di coltura circa la metà dell'azoto fissato come ammonio, ma in simbiosi non si verifica escrezione di composti azotati, poiché la glutammino-sintetasi della felce provvede a che tutto l'ammonio prodotto dell'attività N_2 fissatrice di *Anabaena-Azollae* venga assimilato dalla pianta (PETERS ed altri, 1977).

La conoscenza di tale comportamento, che differenzia il metabolismo dei cianobatteri azotofissatori liberi da quelli simbiotici, riveste importanza per la nutrizione azotata del riso come verrà precisato più avanti nelle tecniche di impiego dell'*Azolla* in risicoltura.

Altro aspetto interessante, rilevato da PETERS ed altri (1976), è che il sistema azotofissatore della simbiosi *Azolla-Anabaena* non appare inibito dalla presenza di azoto combinato (ammonio, nitrato, urea). In presenza di 2,5 mM di ammonio la crescita di *Azolla* è paragonabile a quella conseguita in assenza di azoto combinato.

Tale comportamento, del quale non si conosce ancora il meccanismo, fa della simbiosi *Azolla-Anabaena* l'unico caso in natura in quanto il sistema azotofissatore delle altre simbiosi (*Rhizobium*-leguminose, *Frankia*-non leguminose) risulta molto sensibile alla presenza di azoto combinato.

Per queste ragioni, l'*Azolla* rappresenta un attrattivo candidato per la produzione fotosintetica di fertilizzanti azotati.

Impieghi dell'Azolla in agricoltura

Azolla pinnata viene utilizzata da secoli come concime verde per il riso nel Vietnam e in Cina (nel Vietnam vi è un tempio dedicato ad essa).

La coltura di *Azolla* è stata pure integrata nella risicoltura in Thailandia (MOORE, 1969), Indonesia (SOUBERT, 1949), India (SINGH, 1977), Formosa (LIU, 1976) e nelle Filippine (WATANABE, 1977).

L'IRRI (International Rice Research Institute) sta conducendo ricerche in collaborazione con vari Paesi e tiene corsi al fine di divulgare le conoscenze su *Azolla* e favorirne l'impiego come fertilizzante organico azotato per la coltivazione del riso nella Asia meridionale e sud-orientale.

Le modalità agronomiche d'impiego di *Azolla* nella risaia sono: in consociazione o in rotazione prima o dopo la coltura del riso.

A) - *Consociazione con il riso*

In diverse località risicole del sud-est asiatico, *Azolla* viene inoculata in consociazione al riso. SINGH (1979) riporta che in India 200-1000 Kg di biomassa di *Azolla* per ha vengono inoculate nelle risaie insieme alle piantine di riso. *Azolla* viene lasciata crescere per 30-40 giorni dopo di che viene interrata.



Fig. 2. — *Azolla* in consociazione con il riso, nel sistema di semina a doppie file ravvicinate (da reperti FAO/UNDP The peoples republic of China).

L'effetto sulle piante di riso è quasi immediato e si manifesta con una crescita più rapida, colore verde più intenso e anticipo della fioritura.

Un innovativo sistema di coltivare *Azolla* in consociazione al riso è quello attuato da alcuni risicoltori cinesi che va sotto il termine « a doppie file ravvicinate » (Fig. 2). Il sistema, sperimentato dall'IRRI, consiste nel seminare il riso in doppie file distanti circa 10 cm l'una dall'altra e coltivare *Azolla* negli spazi liberi di circa 60 cm che rimangono tra una doppia fila e l'altra. *Azolla* viene lasciata crescere per 30-40 giorni dopo di che viene interrata nel suolo al momento dell'asciutta. Usando questa tecnica LIU (1979) riporta produzioni record di riso di 14 t. per ha e di 140 t. di biomassa fresca per ha, equivalente ad un apporto di azoto per ha di oltre 100 Kg.

Tra le specie di *Azolla* studiate, *Azolla mexicana*, secondo le ricerche di TALLEY e RAINS (1980) si è dimostrata l'unica, in cui dal 10 al 30% dell'azoto fissato è perduto nel mezzo di coltura come $N-NH^+_4$. Le alte rese di risone ottenute nella doppia coltura di *Azolla*, in rotazione ed in consociazione al riso, dimostrano che l'azoto liberato nell'acqua di risaia, nel caso della coltura di *Azolla mexicana*, viene utilizzato dal riso. I risultati permettono di concludere che la biomassa di *Azolla* deve prima morire perchè l'azoto diventi assimilabile dalle piante di riso.

Gli studi di SOUBERT (1949) su *A. pinnata*, di PETERS ed altri (1977) su *A. caroliniana* e quelli recenti di VINCENZINI ed altri (1984) su tre specie di *Azolla* (*A. caroliniana*, *A. pinnata* e *A. filiculoides*) rilevano che scarsi quantitativi di azoto vengono escreti nei mezzi di coltura, confermando che la morte e la decomposizione sono necessarie per il trasferimento dell'azoto fissato alla pianta.

Tuttavia, va rilevato che nel corso dell'attività vegetativa di *Azolla* è stata evidenziata da FLORENZANO ed altri (1980), nei mezzi di coltura, la formazione di complessi umo-simili originati dal distacco dei rizoidi. Tali composti che rappresentano il 2% della biomassa fresca di *Azolla*, esercitano effetti favorevoli sulla crescita di alcune piante agrarie saggiate.

Infine non va trascurata l'importante funzione che *Azolla*, ricoprendo come un tappeto verde la superficie della risaia, esercita nel controllo di molte erbe infestanti, come risulta dagli studi di RAINS e TALLEY (1979) e di WATANABE (1982).

B) - La Rotazione *Azolla* - Riso

Il principale uso della biomassa di *Azolla* è quello di sovescio per il riso. Una produzione di biomassa di $1 \text{ t.} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{giorno}^{-1}$, quale si realizza nei Paesi del sud-est asiatico, contiene circa 3 Kg di azoto fissato equivalente a 15 Kg di solfato di ammonio o 7 Kg di urea.

Se si considera che *Azolla* ha un tempo di raddoppiamento di 3-5 giorni, ben si comprende che la biomassa di *Azolla* da sola è in grado di provvedere alla nutrizione azotata del riso.

Azolla, utilizzata per sovescio, viene coltivata in India, Vietnam e Cina, nelle stesse vasche di risaia, nei mesi precedenti la semina o il trapianto del riso, impiegando una quantità di inoculo pari a 1 t. di biomassa fresca per ha insieme a 20 Kg di P_2O_5 . Dopo 10-20 giorni l'*Azolla* viene interrata e si procede nel contempo al trapianto del riso.

Un sovescio di 10 t. di biomassa di *Azolla* apporta un equivalente di 30 Kg di azoto per ettaro sufficienti per conseguire una produzione di risone di circa 2 t..

Durante il periodo invernale, due metodi vengono essenzialmente im-

piegati per la conservazione della biomassa di *Azolla* destinata all'inoculo nelle vasche di risaia. Uno, più costoso, ma di sicuro affidamento, è quello di proteggere con un telo di plastica la superficie delle vasche. L'altro, più economico, consiste nel conservare la biomassa in fosse larghe 1 m scavate nel terreno per una profondità di 1 m e coibentate con paglia. In tali fosse vengono conservati 200 Kg di biomassa di *Azolla*.

Esperimenti condotti in California da TALLEY ed al. (1977) e TALLEY e RAINS (1980), intesi a verificare la potenzialità di *Azolla* come fonte di azoto nella risicoltura di zone temperate, confermano, nel complesso, con le specie indigene di *A. filiculoides* e *A. mexicana*, i risultati conseguiti nei paesi del sud-est asiatico.

Tali AA. propongono di utilizzare in successione due specie di *Azolla* e precisamente *A. filiculoides*, più resistente al freddo nei mesi da novembre ad aprile e sovesciare la biomassa prodotta in primavera prima della semina del riso, e *A. mexicana*, più sensibile al freddo e capace di liberare una maggiore % di azoto fissato, in consociazione alla coltura del riso.

La decomposizione nel suolo della biomassa di *Azolla*, che ha un rapporto C/N di 10, è molto rapida ed avviene entro 15-20 giorni.

SINGH (1979) riporta che nei suoli di risaia indiani, *Azolla* è decomposta dopo 8-10 giorni e che il riso è in grado di utilizzare dopo 20-30 giorni dall'interramento il 70% dell'azoto contenuto nella biomassa di *Azolla*.

Analoghi risultati sono stati rilevati in parcelle sperimentali da FAVILLI ed altri (1983) con il sovescio di *Azolla caroliniana*.

Coltura massiva di Azolla caroliniana.

Il nostro Centro, che attualmente dispone di una collezione di specie di *Azolla* di varia provenienza, si è interessato a partire dal 1978 (MARGHERI ed altri, 1979) alla coltura massiva di *Azolla* per verificare nelle condizioni climatiche del nostro Paese la possibilità d'impiego di questo sistema biologico di fertilizzazione azotata nelle risaie italiane.

I risultati preliminari, conseguiti in unità di coltura di 1-5 m² di superficie nel periodo compreso da maggio a settembre, furono incoraggianti, nonostante le basse rese conseguite (g 3,7 di biomassa secca · m⁻² · giorno⁻¹), per l'alto contenuto di N₂ fissato nella biomassa (5,1%), per il basso costo di conduzione della coltura, per le modeste esigenze nutritive della felce (mezzo senza azoto-combinato, e bassa concentrazione dei sali minerali) e per la facilità della raccolta.

I recenti progressi compiuti nella ottimizzazione dei parametri colturali, tra i quali, la densità di copertura che esercita una notevole influenza sulle rese, hanno portato ad ottenere significativi incrementi sulla produttività di

Azolla in coltura massiva, come risulta dai dati riportati in Tab. 1 (MARGHERI ed altri, 1982; VINCENZINI ed altri, 1984).

In considerazione del fatto che tali risultati sono stati conseguiti in unità di coltura di 1 m² di superficie, l'aumento di scala è stato il logico sviluppo della sperimentazione, per una verifica, in una unità di superficie significativa, della produttività di *Azolla*.

I risultati vengono qui di seguito sinteticamente riportati. Le esperienze di coltura all'aperto di *Azolla filiculoides* hanno interessato il periodo compreso tra maggio ed ottobre 1984.

Tab. 1. — Effetti della densità delle piantine di *Azolla* sul tasso specifico di crescita e sulla produttività (da VINCENZINI ed al., 1985).

Specie di <i>Azolla</i>	Densità media (Peso secco g · m ⁻²)		Tasso specifico di crescita (giorno)	Produttività (g · m ⁻² · giorno ⁻¹)	
	Iniziale	Finale		Peso secco	Azoto
<i>A. pinnata</i>	23	42	0.35	7.6	0.37
	37	68	0.31	11	0.53
	61	151	0.10	6.	0.33
<i>A. filiculoides</i>	21	39	0.36	7.2	0.37
	37	66	0.30	10	0.54
	58	140	0.11	7.4	0.38
<i>A. caroliniana</i>	24	44	0.35	8.1	0.42
	38	70	0.31	11.5	0.60
	55	136	0.13	8.1	0.42

L'unità di coltura è costituita da una vasca in calcestruzzo di 100 m² di superficie, suddivisa in paratie in P.V.C. in tre settori comunicanti tra loro (Figg. 3 e 4).

Il mezzo di coltura impiegato è la soluzione nutritiva (senza azoto-combinato) di Hoagland 2/5 concentrata a pH 6,5 (MARGHERI ed altri, 1979 l.c.) per un volume di 10.000 litri (livello nella vasca di 10 cm).

Inizialmente si è proceduto all'inoculo del primo settore della vasca (m² 33) con una quantità di biomassa di *Azolla filiculoides* pari a circa 10 g · m⁻². Dopo 5 giorni dal primo settore si è prelevato la biomassa per l'inoculo del II settore e successivamente, procedendo nella stessa maniera, è stato inoculato il III settore.

L'intera superficie della vasca è risultata coperta dalla vegetazione dopo 10 giorni dall'inoculo.

La fase di avviamento si è conclusa in 15 giorni con il raggiungimento della densità di copertura di circa 50 g · m² che rappresenta il valore ottimale stabilito per *Azolla caroliniana* (VINCENZINI ed altri, 1984) per l'ottenimento

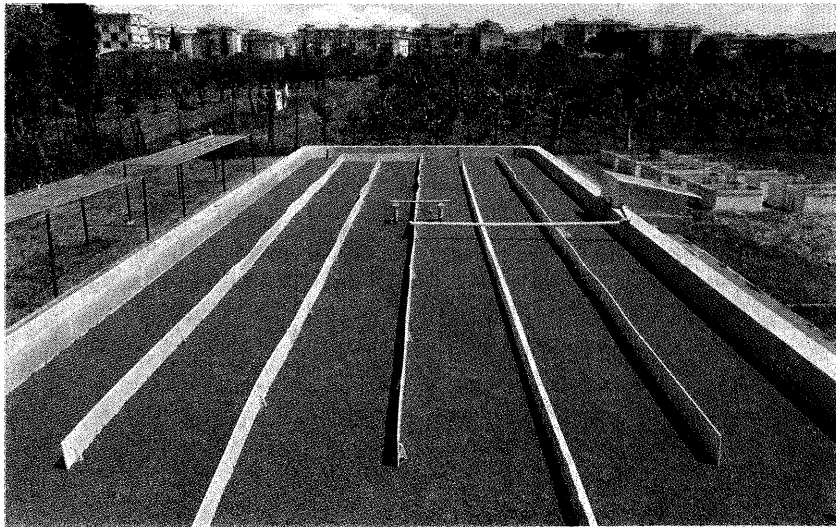


Fig. 3. — Coltura massiva di *Azolla filiculoides* nella unità da 100 m² di superficie.

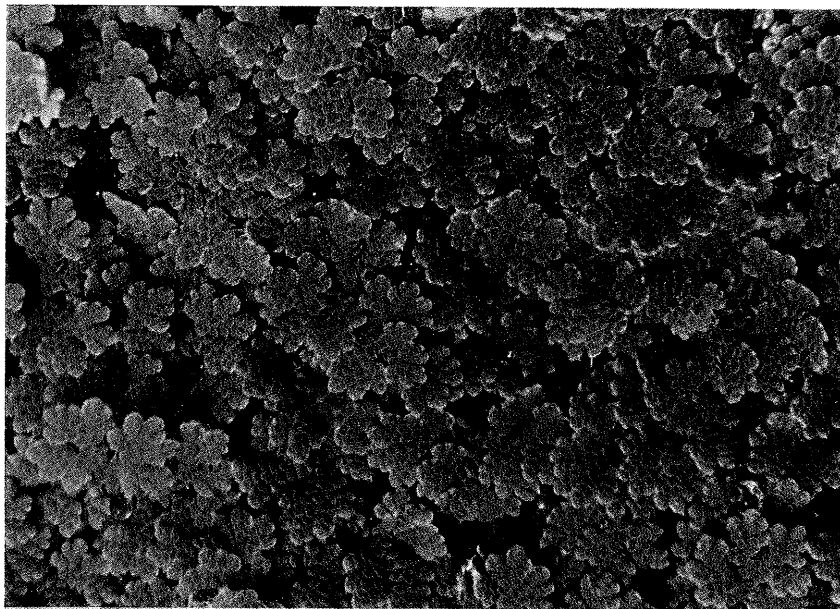


Fig. 4. — Aspetto morfologico di *Azolla filiculoides* in coltura massiva all'aperto.

delle più alte rese. Tale densità è stata mantenuta pressochè costante per tutto il corso della esperienza procedendo ogni 3-4 giorni alle raccolte della biomassa mediante un apposito dispositivo a rete a maglie larghe di 0,7 cm².

Nella Tab. 2 vengono riportate le produttività registrate nel corso dei periodi sperimentali unitamente ai dati delle quantità di azoto fissato, dei tassi di crescita giornalieri e delle condizioni di temperatura e di luce naturali.

La coltura di *Azolla filiculoides* per il periodo considerato ha dato rese variabili da 5,56 a 15,28 g di prodotto secco · m⁻² · giorno⁻¹ con tempi di raddoppiamento oscillanti tra 2,5 e 6 giorni. La resa media per l'intero periodo

Tab. 2. — Crescita e produttività di *Azolla caroliniana* in coltura massiva all'aperto (unità di coltura di 100 m²).

Periodo	Rese (g·m ⁻² ·giorno ⁻¹)			Temperature medie				Radiazione Keal · m ⁻² · giorno ⁻¹
	Biomassa	N ₂ - fissato	Tasso di crescita: Raddoppiamenti per giorno	Ambiente (°C)		Mezzo di coltura (°C)		
				min.	max.	min.	max.	
1/6-30/6	11,27	0,512	0,263	14,20	30,0	17,0	25,0	5.909
1/7-30/7	15,28	0,695	0,395	14,8	33,0	18,5	26,0	8.408
31/7-30/8	11,70	0,532	0,292	17,0	32,0	20,6	26,5	7.00
31/8-1/10	8,37	0,381	0,219	14,0	26,0	17,0	22,0	4.100
2/10-30/10	5,56	0,253	0,147	10,0	21,0	14,0	17,0	2.230
2/10-30/10	5,56	0,253	0,147	10,0	21,0	14,0	17,0	2.230
Media generale gg. 120	10,44	0,475	0,263					

è risultata di g 10,44 di sostanza secca · m² · giorno⁻¹ cui corrisponde una produzione di 2 t. · ha⁻¹ · giorno⁻¹ di biomassa fresca di *Azolla*.

Considerando un contenuto medio di azoto nella biomassa secca del 5%, la quantità di azoto fissato è pari a circa 5 Kg · ha⁻¹ · giorno⁻¹.

La biomassa fresca di *Azolla filiculoides* contiene il 94-95% di acqua, che si riduce al 5-7% in quella essiccata al sole.

Per quanto riguarda la correzione del pH e la reintegrazione degli elementi nutritivi, è stato seguito il seguente protocollo: il pH viene mantenuto costantemente intorno a 6,5; il fosforo, che rappresenta l'elemento maggiormente richiesto da *Azolla*, è stato tenuto costantemente sotto controllo, procedendo all'integrazione dopo ogni raccolta ed allorquando il contenuto di fosforo del mezzo di coltura risultava al di sotto di 1/3 di quello di partenza; gli altri componenti del mezzo di coltura, compresi i microelementi, sono stati reintegrati ogni 10-15 giorni. Degne di nota appaiono le rese conseguite nel mese di luglio, che hanno superato i 15 g di p.s. · m⁻².

giorno⁻¹, cui corrisponde un contenuto di azoto fissato pari a circa g 0,70 m² giorno. Tali rese elevate, paragonabili a quelle delle colture massive di microalghe e cianobatteri, sono state conseguite applicando alla coltura di *Azolla* le tecniche adottate nella conduzione della coltura all'aperto dei microrganismi fotosintetici.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Da quanto sinteticamente esposto emergono prospettive interessanti per l'impiego agricolo di *Azolla* nel nostro Paese.

Come fertilizzante organico azotato per il riso, l'impiego di *Azolla* presuppone alcune considerazioni fondamentali che scaturiscono dall'esperienza della risicoltura dei Paesi del sud-est asiatico.

La produzione di 1 t. di risone richiede una somministrazione di azoto di circa 20 Kg per ha.

Le differenti forme di fissazione biologica dell'azoto (simbiotica: *Anabaena-Azolla*; asimbiotica: batteri eterotrofi associati alle radici e libera, cianobatteri eterocistati e clostridi) che si vengono ad instaurare in una risaia danno la possibilità al riso di produrre circa 2 t. di risone ad ha (SWAMI-NATHAN, 1984). Questa è la ragione per cui gli agricoltori asiatici hanno raccolto per secoli da 1 a 2 t. di riso per ha senza ricorso ai fertilizzanti azotati.

L'Italia, se si esclude l'Unione Sovietica, è in Europa il paese maggior produttore di riso con 1 milione di t. su una superficie di circa 180.000 ha, concentrata nelle provincie di Vercelli, Pavia e Novara. La produzione unitaria, grazie al miglioramento genetico delle varietà ed al livello tecnologico raggiunto, è una delle più alte del mondo: 5-6 t. · ha⁻¹. Per conseguire una tale produzione, limitando ovviamente il discorso al bilancio azotato, risultano necessari 100 Kg di azoto corrispondenti a circa 5 q. di solfato ammonico.

Il 70% del fabbisogno azotato si può soddisfare sovesciando 25 t. di biomassa fresca di *Azolla* contenente lo 0,3% di azoto. Tale produzione di biomassa può essere ragionevolmente ottenuta, nell'arco di 40 giorni (mesi di aprile e maggio), da una coltura massiva di *Azolla* utilizzando come unità di coltura gli stessi campi di risaia (parametri coltura/ha: inoculo 2 t. biomassa, superfosfato 20 Kg, espressi come P₂O₅, tasso di crescita della biomassa fresca per giorno Kg 600).

Un successivo inoculo di *Azolla*, in consociazione al riso, consentirebbe di ottenere i seguenti vantaggi:

- 1 - Rilascio, nell'acqua di risaia, di una frazione dell'azoto fissato,

(per *Azolla mexicana* è stato valutato dal 10 al 30% di quello fissato) e di quello che si libera, dalla degradazione di quella parte di *Azolla* che muore, nel corso dello sviluppo vegetativo nella risaia.

2 - Formazione di complessi umo-simili originati dal distacco dei rizoidi, che stimolano lo sviluppo del riso.

3 - Controllo delle erbe infestanti che si realizza per effetto della completa copertura della superficie dell'acqua di risaia.

Se agli apporti di azoto dei punti 1 e 2 si aggiungono quelli derivanti dalla fissazione libera (cianobatteri e clostridi) e dei batteri azotofissatori associati alla radice del riso, si può concludere che il totale fabbisogno di azoto per la coltura del riso, può essere convenientemente assicurato, senza ricorso ai fertilizzanti chimici, con la introduzione dell'*Azolla* nella tecnica risicola in rotazione al riso, prima della semina e in consociazione poi, durante lo sviluppo.

È infine da rilevare, che dopo il raccolto del riso, il suolo viene a ricevere una biomassa fresca di *Azolla* stimata per oltre 120 t. per ettaro cosicché una coltura in successione al riso, troverebbe disponibile nel suolo una quantità di azoto di oltre 300 Kg · ha⁻¹.

Se l'introduzione di *Azolla* nella tecnica risicola consente di ottenere risultati vantaggiosi sotto ogni punto di vista, la biotecnologia della coltura massiva rappresenta l'aspetto più stimolante ed innovativo nel campo della produzione di biomasse vegetali altamente qualificate per usi diversificati in agricoltura.

L'applicazione alla coltura massiva di *Azolla* di talune tecniche, adottate nella conduzione delle colture all'aperto dei microrganismi fotosintetici, ha portato ad ottenere rese elevate paragonabili a quelle conseguite dalla coltura massiva delle microalghe e dei cianobatteri.

È stata infatti ottenuta, in una unità di coltura di 100 m², dal nostro Centro, nell'arco di 5 mesi una resa media di 10,5 g di biomassa (peso secco) · m⁻² · giorno⁻¹ cui corrisponde una produzione in peso fresco di 2 t. · ha⁻¹ · giorno⁻¹.

Considerando un contenuto medio di azoto nella biomassa essiccata del 5%, la quantità di azoto fissato è valutabile a 5 Kg · ha⁻¹ · giorno⁻¹.

Non va trascurato il fatto che tali produzioni sono state conseguite con un basso costo di conduzione delle colture e che l'unità di coltura per *Azolla* può essere costituita da un semplice vasca ricavata nel terreno, senza rivestimenti particolari, ciò che facilita la realizzazione della coltura massiva di *Azolla* a livello aziendale.

Le utilizzazioni della biomassa di *Azolla* prodotta verrebbero ad essere più diversificate ed interessare il settore dei mangimi e quello dei fertiliz-

zanti organici, trascurando quello energetico (produzione di biogas) ritenuto non conveniente.

Azolla costituisce una buona fonte alimentare per diverse specie di animali domestici, perchè il prodotto sia fresco che essiccato è appetibile e perchè le proteine (28-30% sul secco) hanno un valore biologico paragonabile a quello di una buona leguminosa, com'è risultato da prove comparate di alimentazione su conigli (dati non pubblicati).

Per quanto concerne il settore dei fertilizzanti, *Azolla* potrebbe essere un valido ingrediente nella preparazione di composts ad alto valore biologico, sia per il contenuto di azoto della biomassa, sia perchè consente di realizzare l'« effetto priming » sulla microflora del suolo derivante dall'apporto di sostanza organica fresca facilmente degradabile.

Le linee future di studio vertono sul miglioramento genetico della simbiosi *Anabaena-Azolla* al fine di ottenere ceppi di *Azolla* efficienti ed adatti a svilupparsi a basse temperature per conservare all'aperto la coltura durante l'inverno.

Il ricorso alla tecnica della coltivazione in vitro dei tessuti (PTC) può per l'*Azolla* rappresentare uno strumento efficace per il conseguimento dei fini proposti.

BIBLIOGRAFIA

- AVENA G.C., BLASI C. e RUBECA L. (1974) — *Azolla caroliniana Willd., esotica naturalizzata, nuova nella flora del Lazio*. Ann. Bot. vol. XXXIII, 195-208.
- DAO THE TUAN, TRAN Q.T.C. (1966) — *Introducing Azolla into crop rotation of rice growing areas as a major crop*. Khoa Hoc Ky Tuat Nong Nghiep (Agricultural Science and Technology) 59: 654-658.
- FAVILLI F., MATERASSI R., BALLONI W., FLORENZANO G. (1983) — *The fate of Azolla biomass in the soil*. In: Humus et Planta. VIII Inter. Symposium Prague - CSSR Vol. I.
- FLORENZANO G., (1983) — *Fondamenti di Microbiologia del terreno*. - REDA, 384-394.
- FLORENZANO G., BALLONI W., MATERASSI R., TORZILLO G. (1980) — *Preliminary report on the production of a humo-mineral complex by Azolla in mass culture*. Agric. Ital. 109 (35 n.s.); 283-287.
- FJERDINGSTAD E. (1976) — *Anabaena variabilis status azollae*. Arch. Hydrobiol. Suppl. 49 Algol. Studies, 17, 177-381.
- IRRI - INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE (1979) — *Bibliography on Azolla*. 66.
- LIU C.C. (1979) — *Use of Azolla in rice production in China*. In: Nitrogen and Rice, Int. Rice Res. Inst. 375-394.
- LUMPKIN T.A. and PLUCKNETT, D.A. (1980) — *Azolla: Botany, physiology, and use as a green manure*. Economic Botany 34 (2), 111-153.
- MARGHERI M.C., SILI C., VINCENZINI M., BARSANTI L., MATERASSI R. (1984) — *On the N₂-fixing efficiency in mass culture of different Azolla spp.* Adv. in Nitrogen

- Fixation Research. 59. Veeger C., Newton W.E. (eds) M. Nijhoff W. Junk publ.
- MARGHERI M.C., MATERASSI R., BALLONI W., PAOLETTI C. (1979) — *Coltura massiva di Azolla caroliniana: Prime esperienze in Italia ed importanza agronomica del processo*. Agric. Ital., 108 (34 n.s.) 199-310.
- MARGHERI M.C., TOMASELLI L., FILPI C. (1982) — *Research on the mass culture of Azolla caroliniana and A. filiculoides in Italy*. Int. Workshop on Practical application of Azolla for rice production. Mayaguez, Puerto Rico.
- MOORE A.W. (1969) — *Azolla: Biology and agronomic significance*. Bot. Rev., 35, 17-34.
- PETERS G.A. (1975) — *The Azolla-Anabaena-azollae relationship III. Studies on metabolic capabilities and a further characterization of the symbiont*. Arch. Microbiol., 103, 113-122.
- PETERS G.A. and MAYNE C. (1974) — *The Azolla-Anabaena-azollae relationship I. Initial characterization of the association*. Plant Physiol. 53, 813-819.
- PETERS G.A., EVANS W.R., TOIA R.E. (1976) — *Azolla-Anabaena-azollae relationship IV. Photosynthetically driven nitrogenase catalyzed H₂ production*. Plant Physiol., 58, 119-126.
- PETERS G.A., TOIA R.E. JR., LOUGH S.M. (1977) — *Azolla-Anabaena-azollae relationship V. ¹⁵N₂ fixation, acetylene reduction, and H₂ production*. Plant Physiol. 59, 1021-1025.
- RAÍNS D.W., TALLEY N.S. (1979) — *Use of Azolla in North America in: Nitrogen and Rice*. Int. Rice Res. Inst. 419-433.
- SOUBERT G.P. (1949) — *Provisional communication on the fixation of elementary nitrogen by a floating fern*. Ann. Royal Bot. Gard. (buitenzorg) 51, 177-197.
- SINGH P.K. (1977) — *Multiplication and utilization of fern Azolla containing N-fixing algal symbiont as green manure in rice cultivation*. Il Rizo 26, 25-137.
- SINGH P.K. (1979) — *Use of Azolla in Rice production in India*. In: *Nitrogen and Rice*. Int. Rice Res. Inst. 407-418.
- SWAMINATHAN M.S. (1984) — *Il Riso*. Le Scienze, 187, 109-117.
- TALLEY S.N., TALLEY J. and RAINS D.W. (1977) — *Nitrogen fixation by Azolla in rice fields*. In: *A Hollaender* (ed.). Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. 259-281. Plenum Press.
- TALLEY S.N., RAINS D.W. (1980) — *Azolla filiculoides Lam. as a fallow-season green manure for rice in a temperate climate*. Agronomy J., 72, (1) 11-18.
- TALLEY S.N. and RAINS D.W. (1980) — *Azolla, as a nitrogen source for temperate rice*. In: *Nitrogen fixation*, Vol. 2, 311-320. Newton W.E. and Orme-Johnson W.H. (eds) Univ. Park Press.
- VINCENZINI M., MARGHERI M.C., SILI C. (1985) — *Outdoor mass culture of Azolla spp.: yields and efficiencies of nitrogen fixation*. Plant and Soil (in press).
- WATANABE I. (1977) — *Azolla utilization in rice culture*. Int. Rice Res. Newslett., 2, 3.
- WATANABE I. (1982) — *Azolla-Anabaena symbiosis its physiology and use in tropical agriculture*. In: *Nitrogen cycling in ecosystems of Latin America and the Caribbeans* (Robertson G.P., Herrera R., Rosswall edits). 169-185. M. Nijhoff and Junk W. (publs) The Hague, London.

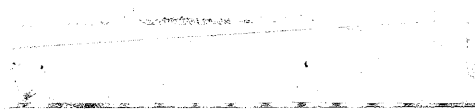


Faint, illegible text or a list of items, possibly a table of contents or a list of parts. The text is too light to read accurately.

Another section of faint, illegible text, possibly a paragraph of description or a list of specifications. The content is mostly lost due to fading.

A third section of faint, illegible text, continuing the list or description. The text is barely visible against the white background.

A fourth section of faint, illegible text, possibly a concluding paragraph or a final list item. The text is extremely light and difficult to discern.



ELENCO DEI PARTECIPANTI AL CONVEGNO

- AGOSTINI Antonella — Via Cesarini, 11 - Trento.
- ANDREATTA Giampiero — Via Garibaldi, 94 - Predazzo (TN).
- ARCARA Dr. Pier Giacomo — Ist. Sperimentale per la Difesa del Suolo,
Ministero Agricoltura e Foreste, P.zza D'Azeglio, 30 - Firenze.
- ARCARO Carmelo — Via Ghibellina, 65 - Firenze
- ARU Prof. Angelo — Dipartimento Scienza della Terra, Università di
Cagliari - Cagliari.
- AVIO Dr. Luciano — Centro di Studio per la Microbiologia del suolo del
C.N.R., Via del Borghetto, 80 - Pisa.
- BALDACCINI Prof. Paolo — Istituto di Geopedologia Università di Sassari -
Sassari.
- BALLONI Prof. Waldemaro — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica,
Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- BAZZICALUPO Prof. Marco — Istituto di Genetica, Università degli Studi,
Via Romana, 19 - Firenze.
- BIAVATI Prof. Bruno — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Università
di Bologna - Bologna.
- BOCCI Dr. Fabio — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Piazzale delle
Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- BONCIARELLI Prof. Francesco — Istituto di Agronomia Generale, Università
di Perugia, Borgo XX Giugno - Perugia.
- BONETTI Dr. Maurizio — ENEA - Casaccia. Via Anguillarese Km. 1,3 -
00100 Roma.
- BONMATI Dr. Manuel — Istituto per la Chimica del Terreno - CNR, Via
Corridoni, 78 - Pisa.
- BOSCO Marco — Via dello Sprone, 3 - Firenze.
- BUCCIONI Luciana — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - CNR,
Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- CAPECCHI Prof. Ilvo — Istituto di Economia agraria Università degli Studi,
Piazzale delle Cascine - 50144 Firenze.
- CARLOZZI Dr. Pietro — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del
CNR, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.

- CASELLA Dr. Sergio — Istituto di Microbiologia agraria, Università di Pisa - Pisa.
- CAVAZZONI Michele — Via Porte Nuove, 40 - 50144 Firenze.
- CECCHI Marco Angelo — Facoltà di agraria, Piazzale delle Cascine - 50144 Firenze.
- CIARDI CARLO — Istituto per la Chimica del Terreno - CNR, Via Corridoni, 78 - Pisa.
- CRESTA Dr. Enrico — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- CRESCENZI Dr. Francesco — ASSORENI, Via Ramarini, 32 - 00015 Monterotondo (ROMA).
- DALLA VOLTA Federico — Via Garibaldi, 7 - 19013 Deiva Marina (SP).
- DE BERNARDIS Laura — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- DE PHILIPPIS Dr. Roberto — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- ALBA Ena — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- FARINI Dr.ssa Anna — Istituto di Chimica Agraria Università di Milano, Via Celoria, 2 - 20133 Milano.
- FAVALORO Prof. Mario — Cattedra di Microbiologia agraria e tecnica, Università di Palermo, Parco d'Orleans - Palermo.
- FAVILLI Prof. Franco — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Università di Firenze, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- FEDERICO-GOLDBERG Prof.ssa Linda — Presidente S.I.S.S. c/o Istituto di Chimica Agraria Università di Milano, Via Celoria, 2 - 20133 Milano.
- FERRARI Prof.ssa Anna Maria — Istituto di Microbiologia agraria, Università di Milano, Via Celoria, 2 - 20133 Milano.
- FIEROTTI Prof. Giovanni — Preside Facoltà di Agraria Università di Palermo, Parco d'Orleans - Palermo.
- FILIPPI Dr. Carlo — Istituto di Microbiologia agraria Università di Pisa, Via S. Michele, 6 - Pisa.
- FLORENZANO Prof. Gino — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Università di Firenze, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- FRASSINETTI Dr.ssa Stefania — Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo - CNR, Via del Borghetto, 80 - Pisa.
- GALLORI Prof. Enzo — Istituto di Genetica, Università degli Studi, Via Romana, 19 - Firenze.

- GAMBONI Dr. Mauro — ENEA-CRE, Casaccia, Via Anguillarese Km 1,300 - Roma.
- GENEVINI Prof. Pier Luigi — Istituto di Chimica agraria, Università di Milano, Via Celoria, 2 - 20133 Milano.
- GERBI Dr. Vincenzo — Istituto di Microbiologia agraria, Università di Torino Via P. Giuria, 15 - Torino.
- GIOVANNETTI Dr.ssa Luciana — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Università degli Studi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- GIOVANNETTI Dr.ssa Manuela — Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo - CNR, Via del Borghetto, 80 - Pisa.
- GISPERT Dr.ssa Maria — Istituto Sperimentale per la Difesa del Suolo, Ministero Agricoltura e Foreste, P.zza D'Azeglio, 30 - Firenze.
- GRANCHI Lisa — Via Cellini, 22 - Sesto Fiorentino (FI).
- GREGORI Dr. Enrico — Istituto Sperimentale per la Difesa del Suolo, Ministero Agricoltura e Foreste, P.zza D'Azeglio, 30 - Firenze.
- IGNESTI Stefano — Viale Righi, 125/3 - Firenze.
- LONGOBARDI Dr. Felice — ASSORENI, Via Ramarini, 32 - 00015 Monterotondo (ROMA).
- LUCETTI Daniele — Via A. Muratori, 14 - Livorno.
- MAGNANI Stefano — Via Austria, 205 - 50126 Firenze.
- MALQUORI Prof. Alberto — Istituto di Chimica Agraria, Università di Firenze, Piazzale delle Cascine, 28 - 50144 Firenze.
- MANCINI Prof. Fiorenzo — Istituto di Geopedologia e Geologia applicata Università di Firenze, Piazzale delle Cascine, 15 - 50144 Firenze.
- MANCINI Dr. Antonio — ENEA-CRE, Casaccia, Via Anguillarese Km 1,300 - Roma.
- MANNELLI Domenico — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- MARGHERI Dr.ssa Maria Cristina — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- MESSINI Dr.ssa Anna — Istituto di Microbiologia agraria e tecnica, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- MICHELACCI Massimo — Via Gora - Pistoia.
- MICLAUS Dr. Nerino — Istituto Sperimentale per la Difesa del Suolo, Ministero Agricoltura e Foreste, P.zza D'Azeglio, 30 - Firenze.
- MORIONDO Prof. Francesco — Istituto di Patologia e Zoologia forestale ed

- agraria Università di Firenze, Piazzale delle Cascine, 28 - 50144 Firenze.
- NARESE FILASTÒ Dr.ssa Marinella — Regione Toscana, Dipartimento Sicurezza Sociale, Via di Novoli, 26 - 50144 Firenze.
- NICASTRO Antonio — Via Calatafimi, 14 - Campi (FI).
- OZINO MARLETTO Prof.ssa Olga — Istituto di Industrie agrarie e Microbiologia Università di Torino, Via P. Giuria, 15 - 10126 Torino.
- PELOSI Dr. Elio — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- PICCI Prof. Giovanni — Istituto di Microbiologia agraria, Via del Borghetto, 80 - 56100 Pisa.
- PICCOLO Alessandro — Istituto Sperimentale per la Difesa del Suolo, Ministero Agricoltura e Foreste, P.zza d'Azeglio, 30 - Firenze.
- POLSINELLI Prof. Mario — Istituto di Genetica, Università di Firenze, Via Romana, 19 - 50100 Firenze.
- PUSHPARAJ Dr. Benjamin — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- RADOGNA Prof. Vito — Istituto di Chimica Agraria, Via Amendola, 165/A - 70100 Bari.
- RANALLI Dr. Giancarlo — Istituto di Microbiologia agraria, Via Celoria, 2 - 20133 Milano.
- RICCI Carlo — Via Brofferio, 30 - Prato.
- RISTORI Prof. Giuseppe — Centro di Studio per i colloidali del Suolo, Piazzale delle Cascine, 28 - 50144 Firenze.
- RIZZUTO Caterina — Università degli Studi, Facoltà di Agraria, Piazzale delle Cascine - 50144 Firenze.
- ROCCHETTI Prof. Giuseppe — Piazzale Porta a Prato, 14 - Firenze.
- RONCHETTI Prof. Giulio — Ist. Sperimentale per la Difesa del Suolo, Ministero Agricoltura e Foreste, P.zza d'Azeglio, 30 - Firenze.
- RUPPOLI Roberto — Via Pescetti, 16 - Firenze.
- RUSSO Dr. Salvatore — Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura Sez. Spec. Riscoltura, Strada per Torino, Km 3,500 - 13-00 Vercelli.
- SACCHI Angelo — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- SADEGHOLVAD Dr. Abbas — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- SELLITRI Vito — Via S. Cristoforo, 24 - Firenze.

- SEQUI Prof. Paolo — Dipartimento di Produzione Vegetale - Università di Udine, Piazzale Kolbe, 4 - 33100 Udine.
- SILI Dr. Claudio — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- SINOSINI Flavio — Borgo la croce, 33 - Firenze.
- SHEJBAL Dr. Jndrich — ASSORENI, Via Ramarini, 32 - 00015 Monterotondo (ROMA).
- SORLINI Prof.ssa Claudia — Istituto di Microbiologia agraria Università di Milano, Via Celoria, 2 - 50133 Milano.
- TARTONI Gabriele — Via Autostrada, 3 - Prato.
- TARUNTOLI Simone — Via Catalani, 10 - Firenze.
- TASSINATO Graziano — Via Fra' Castoro, 1 - Firenze.
- TOMASELLI Dr.ssa Luisa — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi - Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- TORRI Andrea — Facoltà di Agraria Università degli Studi, Piazzale delle Cascine, 18 - Firenze.
- TORZILLO Dr. Giuseppe — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- TREDICI Dr. Mario — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- TURCHETTI Dr. Tullio — Centro di Studio per la Patologia delle Specie Legnose Montane, CNR, Piazzale delle Cascine, 28 - 50144 Firenze.
- VANDONI Dr.ssa Maria Vittoria — Istituto di Chimica agraria Università di Milano, Via Celoria, 2 - 20133 Milano.
- VIGNOLA Dr. Riccardo — ASSORENI, Via Ramarini, 32 - 00015 Monterotondo (ROMA).
- VINCENZINI Dr. Massimo — Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Piazzale delle Cascine, 27 - 50144 Firenze.
- VITALI Dr. Fabio — ASSORENI, Via Ramarini, 32 - 00015 Monterotondo (ROMA).

11/11/21

11/11/21

INDICE DEGLI AUTORI

- Avio L. - 131
Bagnoli G. - 15
Balloni W. - 83, 137
Bocci F. - 35
Carlozzi P. - 137
Crescenzi P. - 65
Cresta E. - 113
Farini A. - 57
Favilli F. - 83, 113
Ferrari A. - 29
Filippi C. - 15
Florenzano G. - 7, 99
Giovannetti L. - 43
Giovannetti M. - 121, 131
Goldberg Federico L. - 57
Longobardi F. - 65
Margheri M.C. - 99, 137
Materassi R. - 35
Messini A. - 83
Pelosi E. - 43
Picci G. - 15
Pushparaj B. - 137
Ramalli G. - 29
Shejbal J. - 65
Sili C. - 43
Sorlini C. - 29
Tomaselli L. - 43
Torzillo G. - 137
Treccani V. - 29
Tredici M.R. - 99
Vandoni M.V. - 57
Vignola R. - 66
Vincenzini M. - 35, 137
Vitali F. - 65

Tipografia Coppini - Firenze