

Sulle variazioni quantitative dei microrganismi del terreno coi vari metodi di conta

(Necessità di una intesa per la unificazione dei metodi per lo studio della carica batterica nel suolo agrario).

Prof. Salvatore Riccardo

(Ricevuto il 16 Settembre 1940-XVIII)

È noto come l'esame microscopico del suolo non abbia mai corrisposto a quello colturale, nel senso che la coltura batteriologica rivelava per il passato un numero di microrganismi immensamente superiore a quello che l'esame microscopico dava a conoscere.

La ragione di simile constatazione è stata trovata circa venti anni or sono da Conn (1), il quale ha fatto vedere che i microbi del suolo preferiscono i colori acidi d'anilina ai colori basici che siamo soliti usare per tutti gli altri campi della batteriologia.

Questi fatti furono in seguito riconfermati da Winogradsky, da Rossi e da altri, e portarono alla conclusione che le vecchie analisi del numero dei microrganismi del suolo avevano perduto molto valore, ed occorreva pertanto sostituire nuove misure per ottenere dati più rispondenti al vero.

Questo per quanto riguarda il numero dei microrganismi; passando alla loro qualità, il fatto è più sconcertante, in quanto che le colture batteriche non possono essere altro che elettive, e rappresentano quindi un numero ristretto di specie.

Fondando gli studi della microbiologia agraria sopra un nuovo indirizzo, basato sull'esame diretto del suolo, si è constatato come le osservazioni microscopiche mettano in evidenza quasi costantemente delle forme che predominano rispetto alle altre (rappresentate quest'ultime da eumiceti, streptotricce, colonie batteriche, e da protozoi), chiamate dal Rossi «ammassi schizomicetici glomerulari» o semplicemente «glomeruli», i quali sarebbero capaci di caratterizzare il terreno in cui questi si trovano, e costituirebbero le apparenze più frequenti dello schizomicete nel suolo.

Il metodo di conta della maggior parte degli schizomiceti vivi in un ambiente qualsiasi è, come si sa, quello di Koch, delle piastre disseminate in gelatina ed in agar comune, ovvero altrimenti preparate. Ma, in quanto ai risultati che si ottengono, abbiamo già messo in evidenza (2) i difetti di tale metodo, specie se le diluizioni del materiale da usare vanno spinte oltre ad 1:10.000.000 perchè in tal caso possono aversi cifre inattendibili perchè troppo varie.

Senza contare che le cifre minime di colonie possono essere errate e alterate da semplice inevitabile inquinamento. Facendo qualche confronto col metodo diretto di conteggio, abbiamo scritto quanto segue: «Trattandosi di terreno, non si poteva che usare il metodo Rossi di conta dei *glomeruli* (3). Per cui uno stesso campione di suolo veniva adoperato per la conta a mezzo delle piastre disseminate e per la conta dei *glomeruli* per grammo. I risultati furono molto favorevoli nelle due determinazioni (233.736 e 253.028) che si presterebbero anche ad una media generale (243.382) di quattro determinazioni. Il che porterebbe ad una media di 2.433.820 di germi (calcolando che ad ogni *glomerulo* si debba riconoscere il valore di 10 germi) o di 24.338.200 se si volesse portare tale valore a 100. Ma bastano queste cifre per dire che se tali cifre coincidono con cifre di *qualcheduna* delle scatole, sono troppo lontane da altre per non ammettere, nel meccanismo delle diluizioni, i fenomeni di selezione di specie o di individui o dell'una e dell'altra».

E così concludevamo:

«Però è da notarsi che in realtà ad un dato momento i due metodi coincidono o quasi. E questo è buon augurio perchè nuove e pazienti ricerche, facendoci conoscere quale sia la diluizione che più corrisponda al vero, ed ammettendo che la conta diretta dei *glomeruli* del terreno corrisponda a tutto quanto si può vedere nel terreno in fatto di schizomiceti, possano conservare al metodo introdotto nella scienza da Roberto Koch, se non tutta, almeno una parte del credito e della creduta utilità che ha avuto fin qui ».

Le esperienze, di cui si dà conto in questo contributo, eseguite con vari campioni di terreno, vogliono collaudare ancora una volta il valore sperimentale della conta degli schizomiceti terricoli in piastre in confronto colla conta diretta microscopica dei cosiddetti « ammassi schizomicetici *glomerulari* » o « *glomeruli* ».

Per la conta dei « *glomeruli* » abbiamo preso in considerazione 100 campi microscopici, rilevati quest'ultimi in due conte di 50 campi ognuna.

Come substrati per lo sviluppo delle colonie, oltre al comune agar-brodo di carne, si è adoperato l'agar all'albuminato di sodio di Waksman ¹⁾ e l'agar all'estratto di terra ²⁾.

La reazione dei substrati veniva corretta a pH = 6,8, e la temperatura di incubazione delle piastre era di 28° C.

I campioni di terra da esaminare venivano prelevati da vari punti del Parco Gussone, il cui terreno costituisce una estesa zona di bosco piantato

¹⁾ Acqua distillata gr. 1000; glucosio gr. 1; K₂ HPO₄ gr. 0,5; MgSO₄ · 7H₂O gr. 0,2; Fe₂ (SO₄)₃ tracce; albume d'uovo sciolto in 0,1 N di Na OH fino a rendere alcalina la fenolfaleina gr. 0,25; agar gr. 15.

²⁾ Un Chilogr. di buon terreno da orto si mescola con un litro di acqua di conduttura, e si pone in autoclave per 30 minuti a 120° C. Il liquido torbido viene filtrato, dopo aggiunta di un po' di talco, attraverso un doppio filtro di carta a pieghe, ottenendo così circa 800 cc. di filtrato. Per preparare un litro di substrato, a 100 cc. di questo filtrato si aggiungono 900 cc. di acqua distillata, gr. 0,5 di K₂ HPO₄ e 15 gr. di agar.

sulla lava del 1631, risultante da detriti di scorie e da ceneri lanciate nelle varie conflagrazioni vesuviane. A questi ingredienti minerali trovasi mescolato il terriccio proveniente dal cumulo dei residui appartenenti ai vegetali, che vivono sulla superficie della lava.

La tabella seguente dà la composizione chimica del terreno che ricopre la lava.

100 gr. di terra fine seccata all'aria contengono materie:				
	Solubili in ac. acetico al 10 %	Solubili in HCl bollente (d. 1,12)	Non attacc. dagli acidi	Somma comples- siva
Anidride silicica	0,182	0,040	37,012	37,234
» fosforica	—	0,508	—	0,508
Ossido di ferro e d'alluminio	0,113	15,929	8,432	24,474
» » calcio	0,638	1,062	5,213	6,913
» » magnesio	tracce	0,054	0,288	0,342
» » potassio	0,090	4,104	0,550	4,744
» » sodio	0,102	0,883	0,719	1,704
Anidride carbonica scioltasi .	0,257	—	—	0,257
Acqua igroscopica	—	—	—	9,387
Perdita a fuoco	—	—	—	4,073
Materia umica	—	—	—	9,376
				99,012

Questa analisi (4) si riferisce al terreno della parte boschiva del Parco, costituita essenzialmente da *Quercus ilex L.* e da piante spontanee.

Ma alcuni appezzamenti del Parco sono stati da molti anni trasformati in campetti sperimentali orto-frutticoli, e quindi il terreno ha subito delle notevoli modificazioni in seguito a laute concimazioni.

I vari prelevamenti del terreno venivano fatti precisamente nelle seguenti località del Parco Gussone: in un campicello coltivato da vari anni ad ortaggi e fiori; in punti non coltivati e dove dominavano leguminose e graminacee spontanee, ovvero in punti difficilmente calcati da piede umano; altri prelevamenti, infine, venivano eseguiti nell'Orto botanico della Facoltà di Agraria, facente parte, anch'esso, del Parco Gussone.

La presa dei campioni veniva fatta ad una profondità di circa 10 cm., smuovendo il terreno mediante la lama di un grosso coltello che che si arroventava alla fiamma di una lampada ad alcool sul posto, e prelevando poscia il campione con un cucchiaino sterilizzato anch'esso alla fiamma, da un punto della parte verticale dello scavo. La terra si poneva, quindi, con le dovute precauzioni antisettiche, in pesa-filtri sterili.

Nelle tabelle I-VI vengono riportati i risultati ottenuti col metodo delle piastre e con quello della conta diretta al microscopio degli « ammassi schizomicetici glomerulari ».

TABELLA I

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	15-V-940	1 : 10.000	28° C.	33.492.000	Terreno del Parco Gussone, coltivato da vari anni ad ortaggi e fiori.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	2.501.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	1.529.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0006	3,24	50	31 ⁽¹⁾	1224	5400	6.609.600	(1) di cui 1 in ognuno di 19 campi e 2 in ognuno di 6 campi.
2	0,0004	3,24	50	22 ⁽²⁾	897	8100	7.265.700	(2) di cui 1 in ognuno di 12 campi e 2 in ognuno di 5 campi.

ALCUNE CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI CHE SI OTTENGONO COL METODO DELLE PIASTRE DISSEMINATE, E BREVE RASSEGNA CRITICA SUI PIU' RECENTI METODI DI CONTA DEI MICRORGANISMI TERRICOLI.

Esaminando i dati delle tabelle I-VI, limitati alle sole piastre, appare subito evidente la differenza dei risultati avuti, per lo stesso terreno, modificando il solo substrato nutritivo. L'agar-brodo di carne ha dato sempre cifre più alte, rispetto all'agar-albuminato di sodio di Waksman e all'agar-estratto di terra. Di questi due ultimi substrati, se si eccettuino le sole tabelle V e VI, le cui cifre sono pressochè uguali, l'agar all'albuminato di sodio di Waksman ha dato, a parità di condizioni, cifre un po' più elevate dell'agar all'estratto di terra.

Se si confrontano, poi, le cifre delle piastre con quelle ottenute mediante la conta diretta al microscopio degli « ammassi schizomicetici glomerulari » le differenze sono minime (eccettuata la sola tab. IV i cui dati sono alquanto

TABELLA II

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	15-V-940	1 : 10.000	28° C.	63.724.000	Terreno del Parco Gussone coltivato da varî anni ad ortaggi e fiori.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	10.032.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	3.405.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0006	3,24	50	26 ⁽¹⁾	1061	5400	5.729,400	(1) di cui 1 in ognuno di 13 campi, 2 in ognuno di 4 campi, 5 in 1 campo.
2	0,0006	3,24	50	18 ⁽²⁾	734	5400	3.963,600	(2) di cui 1 in ognuno di 14 campi e 2 in ognuno di 2 campi.

discordi), considerando, bene inteso, i soli substrati nutritivi all'albuminato di sodio e all'estratto di terra.

Le cifre delle tabelle I-VI, ottenute adoperando la diluizione 1 : 10.000, avrebbero certamente subito delle modificazioni, anche molto sensibili, se si fosse adoperata una diluizione molto alta, per le ragioni esposte altrove (2).

Ma se i due metodi di conta ad un dato momento coincidono o quasi, anche se ciò è buon augurio per perseverare in nuove e pazienti ricerche non vogliamo escludere di prendere in seria considerazione quanto altri Autori hanno fatto per migliorare i metodi di studio della carica batterica nel terreno, sia escogitando nuovi metodi di conta diretta al microscopio, sia adoperando substrati nutritivi più appropriati di quelli finora in uso.

Questo per quanto riguarda — come si è detto — la carica microbica in genere (batteri, actinomiceti ed eumiceti), non volendo qui occuparci dei microbi specifici (anabolici e catabolici), di alcuni processi fondamentali del terreno agrario, il cui numero e la cui attività vengono studiati con appositi accorgimenti e substrati nutritivi.

TABELLA III

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluzione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	12-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	24.693.000	Terreno del Parco Gussone non coltivato; sviluppo spontaneo di leguminose e graminacee.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	2.592.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	1.442.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0016	3,24	50	7 ⁽¹⁾	714	2025	1.445,850	(1) 1 in ognuno di 7 campi.
2	0,0010	3,24	50	6 ⁽²⁾	612	3240	1.982.880	(2) 1 in ognuno di 6 campi.

Dopo che Conn (5) ci fece conoscere la tecnica basata sull'uso dei colori del gruppo eosinico (floxina, eritrosina, rosa bengala) per lo studio dei batteri del suolo, furono le tre memorie di Winogradsky (6-8), comparse a breve intervallo di tempo l'una dall'altra, che fecero soprattutto attirare l'attenzione sulla cosiddetta *microscopia microbiologica del terreno*.

I punti salienti della tecnica raccomandata da Conn erano i seguenti:

Soluzione fissante di gelatina. — Sciogliere a blando calore gr. 0,15 di gelatina in 1 litro di acqua distillata, distribuire in tubi da saggio (5 cc. per tubo) e sterilizzare all'autoclave.

Soluzione colorante. — Sciogliere gr. 1 di eritrosina o rosa bengala in 100 cc. di una soluzione al 0,5% di fenolo, contenente da 0,01 a 0,10 di Ca Cl₂. La quantità precisa di Ca Cl₂ dev'essere determinata sia per il colore da usare che per il terreno da tingere ¹⁾.

¹⁾ Conn consiglia di aggiungere alla soluzione colorante, oltre al fenolo, una piccolissima quantità di un sale di calcio, che ha lo scopo di convertire il colore (acquistato in forma di sale disodico) in sale di calcio, il quale è molto meno solubile del sale disodico.

TABELLA IV

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	12-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	57.523.000	Terreno dell'Orto botanico della Facoltà di Agraria.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	12.117.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	8,950.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0026	3,24	50	6(1)	612	1246	762.552	(1) 1 in ognuno di 6 campi.
2	0,0013	3,24	50	1	102	2492	254.184	

Modo di procedere. — Mettere gr. 0,5 di terreno in 5 cc. della soluzione di gelatina. Mescolare ben bene, versare il contenuto di una grande ansa sopra un vetrino portaoggetti, occupando l'area di circa un cm². Essiccare sopra un bagno-maria bollente, colorare per un minuto, lavare con acqua, asciugare ed osservare al microscopio con forte ingrandimento.

Winogradsky modificò sensibilmente la tecnica di Conn, preparando apposite sospensioni di terreno e introducendo *l'anse jaugée*, di noto volume, per conoscere la quantità dei microrganismi ivi contenuti, mentre Koffman (9), tre anni dopo, descriveva un altro metodo, cosiddetto « capillare », col quale può eseguirsi anche il conteggio dei batteri, in preparati fissati e colorati. Si determina dapprima il coefficiente (che, per la diluizione 1:10 e cc. 0,1 sotto il coprioggetti, è uguale a 100) e quindi il rapporto tra superficie del coprioggetti (delle dimensioni di mm. 40 x 24) e campo visuale.

Così, con obiettivo di 1/12 imm. ed oculare 5 (ingr. di circa 1360), si avrebbe una superficie del campo visuale di mmq. 0,0188596, ed il rapporto

$$\frac{960}{0,0188596} = 50.902, \text{ ossia in cifra tonda } 50.900.$$

TABELLA V

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	22-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	19.917.000	Terreno del Parco Gussone; flora spontanea, e punto difficilmente calcato da piede umano.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	5.680.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	5.066.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli osservati	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0014	3,24	50	10 ⁽¹⁾	1020	2314	2.360.280	(1) 1 in ognuno di 10 campi.
2	0,0008	3,24	50	12 ⁽¹⁾	1224	4050	4.957.200	(2) 1 in ognuno di 6 campi, e 3 in ognuno di 2 campi.

L'esame vien fatto ad una serie di campi visuali, sommando le cifre dei microrganismi trovati, moltiplicando per 50.900, e dividendo infine il prodotto per il numero dei relativi campi visuali.

In ultimo, per calcolare il numero dei batteri contenuti in gr. 1 del campione di terra, si moltiplica la cifra ottenuta per il coefficiente.

Löhnis (10) critica il metodo di Winogradsky, e non esita a dire che « i risultati ottenibili non giustificano in nessun modo l'occorrente impiego di tempo e di lavoro ». Con siffatto metodo, secondo l'A., non viene determinato il solo numero degli organismi viventi, ma anche delle cellule morte sia batteriche che fungine, che possono conservarsi a lungo, specie in terreni acidi, ricchi di *humus*.

Ai rilievi critici di Löhnis si può rispondere che, secondo Rossi (11) ed altri Autori, i batteri che si vedono nel terreno coi metodi di Conn e di Winogradsky sono tutti *vivi*, perchè appena morti dovrebbero decomporsi e sparire. In ogni modo, la colorazione di microrganismi in via di decomposizione non potrebbe riuscire mai perfetta, come tutta la pratica batteriologica ci ha insegnato fin qui.

TABELLA VI

Substrati nutritivi (pH = 6,8)	Data prelevamento terreno	Diluizione adoperata	temperatura termostato	Massimo di microrganismi dopo 7 giorni in 1 gr.	Osservazioni
Agar-brodo	22-VI-1940	1 : 10.000	28° C.	6.349.000	Terreno del Parco Gussone, flora spontanea, e punto difficilmente calcato da piede umano.
Agar-albuminato di sodio di Waksman	»	»	»	1.378.000	
Agar-estratto di terra	»	»	»	1.093.000	

Preparati osservati al microscopio	Peso in grammi	Superficie espressa in cm. ²	Numero dei campi osservati	Numero dei glomeruli	Numero dei glomeruli per cm. ²	Superficie divisa per il peso	Glomeruli per grammo di terreno	Osservazioni
1	0,0010	3,24	50	9 ⁽¹⁾	918	3240	2.974.320	(1) di cui 1 in ognuno di 7 campi e 2 in 1 campo.
1	0,0006	3,24	50	9 ⁽²⁾	918	5400	4.957.200	(2) Idem.

Nel *III Congresso Internazionale della Scienza del suolo*, tenutosi ad Oxford dal 30 luglio al 7 agosto 1935 sotto la presidenza di Russell, Direttore della Stazione Sperimentale di Rothamsted, Thornton insisteva sull'argomento delle fluttuazioni numeriche degli schizomiceti nel terreno. Thornton, nel fare la conta ogni due ore, adoperando il metodo classico delle piastre e, parallelamente, la numerazione diretta al microscopio, otteneva numeri dell'ordine di qualche decina fino a 80 milioni, colle piastre, mentre con la conta diretta dava cifre che potevano raggiungere vari miliardi.

Per eliminare le cause dovute, da una parte, alla dispersione assai ineguale dei germi e, dall'altra, alla difficoltà di determinare esattamente il peso così piccolo della porzione di terra che essi popolano, Thornton, in collaborazione con Gray (12) ebbe l'idea di sospendere le particelle di terra non nell'acqua pura, ma in una sospensione di polvere d'indaco, le cui particelle sono facilmente riconoscibili e numerabili al microscopio. Partendo da questa doppia sospensione si preparano i vetrini: si contano, così, in parecchi campi microscopici i batteri colorati con l'eritrosina fenicata e le particelle d'indaco, determinando infine il rapporto fra le due cifre. Essendo noto il numero di

particelle del colorante in un grammo di terra, è facile calcolare la frazione corrispondente al vetrino.

Le prove hanno dimostrato che l'errore del metodo non oltrepassa il 3.30% e che non dipende da chi esegue la conta; le prove dell'A. hanno ancora dimostrato che, aggiungendo sospensioni batteriche di densità nota ad un terreno sterile, si ritrovano gli stessi numeri con un errore di circa il 3,5%. Dalle numerazioni eseguite con questo nuovo metodo, i campi di Rothamsted avrebbero una densità batterica da 1 a 4 miliardi per grammo di terra. Il rapporto fra la « conta totale » e la « conta con le piastre » raggiunge nei comuni terreni delle cifre che superano 120, mentre, per il terreno coltivato ad essenze prative, questo rapporto si eleva fino ad un massimo di 1780.

Truffaut e Lefouin (13) che hanno effettuato la conta batterica col metodo di Thornton e Gray hanno ottenuto in terreni coltivati a frumento perfino tre miliardi e 800 mila germi per grammo.

Tralasciamo i calcoli matematici di Hwang (14), e passiamo alle più recenti modifiche apportate ai substrati nutritivi da servire per l'allestimento delle piastre.

Gli schizomiceti nei terreni normali sono rappresentati, secondo Conn, per circa il 5-10% da bacilli sporigeni del tipo *Bac. subtilis*, per circa il 10% da bacilli mobili non sporigeni rapidamente liquefacenti (appartenenti soprattutto al tipo *Pseudom. fluorescens*), per il 40-75% da bacilli o cocci non sporigeni che non liquefanno la gelatina o la liquefanno con estrema lentezza, e per il 12-50% da actinomiceti (15). A questi bisognerà aggiungere gli eumiceti, e quindi non è chi non veda la difficoltà di scegliere un substrato nutritivo che risponda bene alle esigenze nutritive della grande maggioranza della microflora terricola.

Fra gli Autori che hanno portato un notevole contributo, tendente a modificare i metodi in uso per lo studio della carica microbica del suolo, un posto preminente spetta a Waksman (16-19).

In una riunione della *Società dei batteriologi americani*, un gruppo di microbiologi agrari pose in discussione il problema dei substrati nutritivi da usarsi nella batteriologia del suolo. Una commissione, composta da Waksman, della New Jersey Agricultural Experiment Station, e da Fred, dell'Università di Wisconsin, propose, com'è noto, i seguenti substrati:

Per i batteri: *agar all'albuminato di sodio; agar al caseinato di sodio; agar e gelatina all'estratto di terra*. Per la composizione chimica del primo substrato si veda a pag. 50; per gli altri terreni rimandiamo alle memorie originali. Reazione: $\text{pH} = 6,8$.

Per gli eumiceti: *terreno acido sintetico*: acqua dist. gr. 1000; glucosio gr. 10; peptone gr. 5; solfato di magnesio gr. 1; agar gr. 25; reazione corretta a $\text{pH} = 4,0$.

Sulla temperatura di incubazione e sul periodo di permanenza delle piastre in termostato, la stessa commissione propose una temperatura di 28°-30° C. (eccetto, bene inteso, per la gelatina), e una permanenza di 8-10

giorni per i batteri, di 14 giorni per gli actinomiceti, e di 2-3 giorni per gli eumiceti.

È ovvio che la diluizione del terreno deve essere modificata, a seconda che si tratti di batteri ed actinomiceti, da una parte, e di eumiceti dall'altra. Per la conta di questi ultimi in mezzi acidi, nei quali viene inibito lo sviluppo dei batteri, il grado di diluizione dev'essere relativamente basso.

Il contenuto microbico degli strati superficiali del suolo è stato studiato da Pagliani, Maggiore e Frattini col metodo delle culture su piastre di gelatina di carne, nelle quali le numerazioni venivano eseguite al termine del terzo giorno (20).

In quanto ad altri substrati, possiamo ricordare l'*agar al decotto di torba* (Perotti) l'*agar sintetico* di Lipman e Brown, l'*agar all'albumina* di Brown, l'*agar al peptone* di Temple, la *gelatina al decotto di terra* e l'*agar-asparagina* di Conn; l'*agar e la gelatina al decotto di terra* di Löhnis, l'*agar al decotto di terra di Fischer*, l'*agar-fagioli*, ecc.

Castelli (21), adoperando in alcune esperienze agar al decotto di terra, agar-albumina, gelatina-albumina, agar-carne e gelatina-carne, ha avuto cifre più elevate con la gelatina di carne.

Verona (22-23) adopera l'agar-fagioli, tenendo le piastre da 10 a 15 giorni a 24°-25° C.

Topping (24-25) ha adoperato i seguenti substrati: agar-brodo diluito-mannite, agar-peptone-estratto di lievito, gelatina-acqua di condotta, agar-caseina-glucosio, agar-asparagina-mannite, agar-estratto di terra.

Julius (26) sostituisce le scatole Petri con flaconcini. Si versa in ciascun flaconcino dell'agar liquefatto, contenente da 1 a 5 gocce del liquido da esaminare, e, mediante apposito apparecchio, si comunica un movimento rotatorio rapidissimo (800-1000 giri al minuto); in tal modo l'agar si solidifica sulle pareti del vetro in strato sottile e perfettamente uniforme, che permette, dopo il periodo di permanenza in termostato, una conta facile delle colonie. Secondo l'A., con l'aiuto di un dispositivo che permetta una rotazione lenta a spirale del flaconcino, si possono arrivare a contare senza fatica fino ad 8.000 colonie, ciò che sarebbe assolutamente impossibile colla tecnica abituale delle scatole Petri.

CONCLUSIONI

I risultati avuti in queste e in molte altre esperienze non fanno che confermare ancora una volta la necessità di trovare un metodo che offra il minimo di errori possibile nella valutazione della carica microbica del terreno agrario.

I risultati contraddittori che si ottengono sono dovuti anzitutto all'incertezza dei metodi stessi, anche fondamentali, per cui, cambiando metodo, cambiano più che sensibilmente i risultati; ma sono dovuti, ancora, all'antagonismo che numero e qualità di microrganismi possono, durante lo sviluppo sulle piastre, esercitare fra di loro. E questo antagonismo è soprattutto accentuato fra actinomiceti e batteri nelle culture di laboratorio (27-31).

E ciò senza contare le giuste osservazioni del Collega Arnaudi (32) là dove dice che «la quantità di schizomiceti che possiamo trovare nel terreno

fertile impiegando metodi adatti al rilevamento, è molto maggiore di quanto non si credesse un tempo. Si tratta talvolta di centinaia ed anche migliaia di milioni di microrganismi per grammo di terra secca. Tale ingente numero di germi è soltanto in piccola parte reperibile nei liquidi circolanti nel terreno; è il complesso solido che alberga i microrganismi, li trattiene e in certa guisa li assorbe. Consegue da ciò la estrema influenza che sulla vita dei microrganismi è esercitata dalla struttura fisico-meccanica del terreno ».

Consegue, pertanto, l'enorme importanza che acquista, per la buona riuscita delle piastre disseminate, l'operazione di agitare bene la prima sospensione del terreno in acqua sterile, onde separare la maggior quantità possibile di batteri dalle particelle solide. L'importanza di tale operazione fa dichiarare, addirittura, a Whittles (33) che adoperando un apposito apparecchio scuotitore, con un certo numero di vibrazioni per minuto, si possono ottenere col metodo delle piastre dei numeri molto prossimi a quelli che si hanno coll'esame diretto microscopico.

Da quanto sopra appare chiaro che:

1) Il solo metodo delle piastre disseminate per la valutazione della carica batterica del terreno agrario non può dare che un giudizio molto vago, che può assumere un certo significato soltanto quando il numero dei microrganismi è molto scarso.

2) I dati numerici ottenuti col metodo delle piastre dovrebbero essere confrontati con quelli che si hanno con uno dei metodi diretti microscopici fra quelli citati e di più facile impiego.

3) Il terreno da esaminare non dovrebbe essere seccato prima di allestire le piastre, perchè il prosciugamento spesso determina diminuzione del numero dei microbi. Siamo, pertanto, di accordo con coloro che consigliano di *preparare un campione perfettamente omogeneo, mescolando numerosi piccoli saggi prelevati in punti diversi del terreno da esaminare, e col loro normale contenuto d'acqua.*

4) Il terreno dovrebbe essere agitato uniformemente per dieci minuti nel preparare la prima diluizione in acqua sterile.

5) In quanto ai substrati nutritivi, siamo d'accordo col Waksman per quanto riguarda la preparazione di due terreni, uno a reazione pressocchè neutra (pH = 6,8) per batteri ed actinomiceti, e l'altro a reazione acida (pH = 4,0) per gli eumiceti. Ciò valga anche per il diverso grado di diluizione.

Riguardo, poi, alla scelta dei vari terreni nutritivi per l'allestimento delle piastre, se si approva il concetto di eseguire parallelamente la conta diretta al microscopio dei batteri e quindi farne la media, non v'è più ragione di essere molto severi, come il Waksman, là dove dice che «un substrato tipico dovrebbe essere impiegato, che non contenesse peptone, estratto di carne, estratto di terreno, o materiale analogo, che ne farebbe variare molto la composizione ».

6) Per ogni campione di terreno dovrebbero essere impiegate almeno 9 piastre, e il loro periodo di incubazione a 28° C. dovrebbe essere di sette giorni al minimo.

RIASSUNTO

Dopo di aver riportato alcuni risultati sulla carica batterica di vari campioni di terreno, ottenuti col metodo delle piastre disseminate e, parallelamente, colla conta diretta al microscopio di ammassi schizomicetici, l'A. fa alcune osservazioni sulla incertezza di tali risultati qualora si adoperi il solo classico metodo delle piastre. Le variazioni numeriche tendono, poi, ad accentuarsi modificando substrati nutritivi e grado di diluizione, senza contare l'antagonismo che numero e qualità di microrganismi possono, durante lo sviluppo nelle piastre, esercitare fra di loro.

L'A. auspica, pertanto, un'intesa fra i microbiologi agrari onde unificare i metodi per lo studio della carica batterica nel suolo agrario. Fra le proposte formulate, si consiglia di fare una media fra i dati ottenuti col metodo delle piastre e quelli ottenuti colla conta diretta al microscopio.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Anführung einiger Resultate betreffend die Bakterienladung verschiedener Erdeproben, deren Untersuchung mit der Plattenprobe und gleichzeitig mit der direkten Zählung der Schizomycetenhäufchen am Mikroskop erfolgt war, macht Verf. mehrere Bemerkungen über die Unsicherheit der Resultate falls man sich ausschliesslich der klassischen Plattenmethode bedient. Mit der Aenderung der Nährböden und des Verdünnungsgrades treten die zahlenmässigen Unterschiede noch mehr in den Vordergrund, selbst ohne Berücksichtigung des Antagonismus der während des Wachstums auf der Platte Zahl und Art der Bakterien gegenseitig ausüben können.

Verf. hält ein Uebereinkommen unter den landwirtschaftlichen Bakteriologen für wünschenswert, damit das Studium der Bakterienladung des Erdbodens mit einer einheitlichen Methode ausgeführt wird. Er macht unter anderem den Vorschlag die mit der Plattenmethode und mit der direkten mikroskopischen Zählung erhaltenen Daten im Durchschnitt zu berechnen und zu verwerten.

BIBLIOGRAFIA

(1) *J. Conn* - The microscopic study of bacteria and fungi in Soil. «Tecn. Bulletin», n. 64 (New York Agr. Exp. Station), 1918.

(2) *G. Rossi* e *S. Riccardo* - Il metodo delle piastre disseminate come metodo di conta dei batteri (Note sperimentali). «Ann. del R. Ist. Sup. Agr. di Portici», 1934, 7, pp. 1-18.

(3) *G. Rossi* e *M. Stanganelli* - Della attendibilità del «metodo Rossi» per la conta dei «glomeruli batterici» nel terreno agrario. «Ann. del R. Ist. Sup. Agr. di Portici», 1932, 5, pp. 233-268;

(4) *E. Casoria* - Mutamenti chimici che avvengono nelle lave vesuviane per effetto degli agenti esterni e della vegetazione. Stab. Tip. Vico Tiratorio 25, Napoli, 1888.

- (5) *J. Conn* - On the microscopic method of studying bacteria in Soil; «Soil Science», 1928, 2, p. 257-259.
- (6) *S. Winogradsky* - Études sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode. «Ann. de l'Inst. Pasteur», 1925, 39, pp. 299-354.
- (7) *S. Winogradsky* - Études sur la microbiologie du sol. (Deuxième mémoire). Sur les microbes fixateurs d'azote. «Ann. de l'Inst. Pasteur», 1926, 40, p. 455-520.
- (8) *S. Winogradsky* e *J. Ziemecka* - Études sur la microbiologie du sol. (Troisième mémoire). Sur le pouvoir fixateur de terres. «Ann. de l'Inst. Pasteur», 1928, 42, pp. 36-62.
- (9) *M. Koffman* - Eine Methode zur direkten Untersuchung der Mikrofauna und der Mikroflora des Bodens. «Centr. für Bakt.» II Abt. 1928, 75, pp. 28-45.
- (10) *F. Löhmis* - Der heutige Stand der Bodenbiologie. «Mitteilungen der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft». Anno 43, Berlin, 1928, pagine 739-743.
- (11) *G. Rossi* e *G. Gesuè* - Di un nuovo indirizzo nello studio biologico del suolo. «Annali di Tecnica Agraria». Roma, 1930, fasc. 2, pp. 196-248.
- (12) *H. G. Thornton* e *P. H. Gray* - The number of bacterial cells in field soils, as estimated by the radio method. «Proc. Roy. Soc. London», 115, 1936, pp. 522-543.
- (13) *G. Truffaut* e *M. Lefouin* - De l'influence de la microflore du sol sur la végétation du blé. «Compt. Rendus de l'Acad. des Science», Paris, 1933, 97, pp. 787-789.
- (14) *Yellow Hwang* - Ueber die Möglichkeiten der logarithmischen Darstellung des Mikroorganismenzahlen. «Archiv Mikrobiol.», 1938, 9, pp. 253-267.
- (15) *G. De' Rossi* - Microbiologia Agraria e Tecnica, U.T.E.T., 1927, p. 1031.
- (16) *S. A. Waksman* - Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: I. The mathematical interpretation of numbers of Microorganisms in the soil. «Soil Science», 1922, 14, pp. 81-100.
- (17) *S. A. Waksman* - Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: II. Methods of the study of numbers of Microorganisms in the soil. «Soil Science», 1922, 14, pp. 283-98.
- (18) *S. A. Waksman* - Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: III. Influence of fertilization upon numbers of Microorganisms in the soil. «Soil Science», 1922, 14, pp. 321-46.
- (19) *S. A. Waksman* e *E. B. Fred* - A tentative outline of the Plate

method for determining the number of Microorganisms in the soil. « Soil Science », 1922, 4, pp. 27-28.

(20) G. De' Rossi - Microbiologia Agraria e Tecnica. U.T.E.T., 1927, p. 1027.

(21) T. Castelli - Ricerche microbiologiche su parcelle di un medesimo terreno coltivato a grano e diversamente concimato. « Atti del IV Congresso Nazionale di Microbiologia », Milano, 3-4-5 ottobre 1932.

(22) O. Verona - Studio microbiologico di un terreno torboso. « Rendiconti Reale Accademia Lincei », Roma, 19, 1934, p. 354.

(23) O. Verona e C. Petroselli - Note batteriologiche su di alcuni terreni delle « Biancane » di Volterra (Pisa). « Nuovi Annali dell'Agricoltura », Roma, Anno 15, N. 2, 1935, p. 318.

(24) L. E. Topping - The predominant Micro-organisms in Soils. I. Description and Classification of the Organisms. « Centralbl. für Bakt. » II Abt., B. 97, N. 14-17, 1937, pp. 289-304.

(25) L. E. Topping - The predominant Micro-organisms in Soils. II. The relative Abundance of the different types of Organisms obtained by plating, and the relation of plate to total Counts. « Central für Bakt. » II Abt., Bd. 98, N. 10-15, 1938, pp. 193-201.

(26) H. W. Julius - Een methode voor het tellen van levende bacterien, vervanging voor de plathmethode. « Antonie van Leeuwenhoek », 5, N. 1, 1938.

(27) J. S. Borodoulina - Les rapports entre les Actinomycetes du sol et « Bac. mycoides ». « Microbiologie », 4, fasc. 4, 1935, pp. 561-586 (dal russo).

(28) S. A. Waksman - Associative and antagonistic effects of microorganisms. I. Historical review of antagonistic relationships. « Soil Science » 42, 1937, p. 51-58.

(29) S. A. Waksman and J. W. Foster - II. Antagonistic effect of microorganisms growing on artificial substrates. *Ibidem*, 43, 1937, p. 69-76.

(30) S. A. Waksman and Imri J. Hutchings. III. Associative and antagonistic relationships in the decomposition of plant residue. *Ibidem*, 43, 1937, p. 77-92.

(31) M. I. Nachimowskaja - Der Antagonisms zwischen den Aktinomyzeten und Bodenbakterien. « Microbiologie », 6, fasc. 2, 1937, pp. 131-157 (dal russo).

(32) C. Arnaudi - Alcuni aspetti della vita microbica del terreno (Pro-lusione letta il 15 gennaio 1940 nella R. Università di Milano).

(33) C. L. Whittles - The determination of number of bacteria in soil. « Journ. Agr. Science ». 13, pp. 18-48, 1923; 14, pp. 346-369; 1924.

