

# **Sull'intervento microbico nei processi di mobilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del terreno agrario**

**Dott. I. Politi** (Vice direttore)

*(Ricevuto il 21 ottobre 1941-XIX)*

È noto che, applicando il procedimento dello Schloesing per la estrazione delle sostanze umiche del terreno, si perviene in realtà alla separazione di complessi colloidali elettronegativi, costituiti, oltre che da sostanza organica, da silice, alluminio, ferro ed acido fosforico. Complessi colloidali di questa natura furono studiati da Antoniani e Politi (1), dai quali, tra l'altro, è stato posto in evidenza che la quantità di acido fosforico legato ai complessi medesimi rappresenta una frazione cospicua del fosforo totale del terreno; Politi (2) poté infatti accertare che nei terreni ordinari essa corrisponde frequentemente ad oltre il 70-80 % del fosforo totale. Le combinazioni di codesta natura costituiscono quindi con ogni probabilità l'essenziale riserva fosforata del terreno agrario ed in pari tempo, verosimilmente, una tappa intermedia obbligata nel ciclo di trasformazioni cui soggiace il fosforo nel terreno stesso. Del resto e per quanto non siano stati del tutto chiariti i legami fra i costituenti dei predetti complessi colloidali, cui nel terreno si trovano indubbiamente legate anche altre basi — particolarmente calcio e magnesio —, è pure risultato che l'acido fosforico vi si trova sotto forma di combinazioni dotate di notevole stabilità e quindi pressochè del tutto immobilizzato e solo lentamente accessibile alla vegetazione.

Alcune esperienze, compiute secondo le indicazioni del metodo Neubauer, hanno infatti dimostrato chiaramente che l'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali, impiegati allo stato di gel, non subisce una apprezzabile utilizzazione da parte delle piante. Utilizzazione apprezzabile si ha invece impiegando gli stessi complessi previamente sottoposti a disidratazione mediante essiccamento su ac. solforico. Ciò s'accorda con una vecchia osservazione del Tacke (3) il quale aveva notato che alcuni terreni ricchi di sostanza organica si rivelano fosfofocarenti se impiegati come tali, mentre manifestano un certo contenuto di fosforo assimilabile se previamente sottoposti ad essiccamento a 50°. È degna di rilievo, in proposito, l'interpretazione che di questo fenomeno diede più tardi il van Bemmelen (4), il quale lo ritenne dovuto all'esistenza di combinazioni d'assorbimento dell'acido fosforico coi colloidali umici, combinazioni che, non accessibili come tali alla vegetazione, lo diverrebbero per effetto di un processo dissociativo conseguente alla disidratazione. A prescindere dal fatto che le combinazioni fosforate non assimilabili non rispondono ai requisiti delle combinazioni d'assorbimento, che

secondo il significato attualmente attribuito ad esse, sono ritenute accessibili alla vegetazione, il concetto del van Bemmelen può essere accettato anche per i predetti complessi umico-minerali del terreno, nel senso che la possibilità di utilizzazione del fosforo ad essi legato è subordinata allo svolgersi di processi che, allentando i legami fra i componenti dei complessi medesimi, rendano libero l'acido fosforico. Particolarmente importante, sotto questo aspetto, appare l'attività degli agenti microbici che presiedono alle ultime fasi di decomposizione della sostanza organica del suolo, ossia alla degradazione del componente umico dei complessi colloidali.

La mobilizzazione del fosforo del terreno è stata oggetto di studio da parte di diversi ricercatori che hanno riconosciuta e indagata l'influenza di vari fattori fisici e chimico-fisici; grande importanza è stata così attribuita ai movimenti del calcio (Hibbard) (5), dovuti a puri fenomeni fisico-chimici o provocati da azioni microbiche (Castellani) (6). Con gli studi sinora compiuti non è stata invece indagata, almeno per quanto mi consta, l'influenza esercitata dai microrganismi sulle combinazioni fosforato umico-minerali, attraverso le loro azioni di decomposizione della sostanza umica (<sup>1</sup>); anche per quanto si è fatto osservare in precedenza, è invece logico ritenere che essa abbia importanza quale causa di modificazioni nella stabilità delle combinazioni dell'acido fosforico coi complessi umico-minerali.

Difatti, come mi risulta da comunicazione verbale, Arnaudi ha potuto ottenere (in ricerche rimaste inedite) lo sviluppo di alcuni microrganismi, particolarmente di ifomiceti, su di un substrato costituito da uno di questi complessi, come fonte esclusiva di carbonio, azoto e fosforo, e da sali minerali; ciò sta ad indicare che il fosforo dei complessi in parola è effettivamente accessibile a certi microrganismi che molto probabilmente ne operano una non trascurabile dissoluzione, come del resto ha potuto desumere lo stesso Arnaudi.

Pertanto mi è parso utile riprendere le ricerche sull'interessante quesito e di esse espongo i risultati ottenuti.

Per l'esecuzione delle ricerche ho impiegato un complesso colloidale estratto da un terreno di prato irriguo. La tecnica seguita può essere così riassunta:

Trattamento del terreno con HCl - 1% in eccesso;  
Eliminazione dell'HCl per decantazione e ripetuti lavaggi con acqua;  
Estrazione con NH<sub>4</sub>OH diluito a circa 3%;  
coagulazione dell'argilla con KCl;  
decantazione ed evaporazione di gran parte dell'NH<sub>3</sub>;  
flocculazione del complesso colloidale mediante lieve acidificazione con

HCl;

— Successive decantazioni e lavaggi con acqua distillata sino a dispersione incipiente del colloide.

— Addizione di KOH sol. N sino a pH = 7.2 e semidispersione.

---

(<sup>1</sup>) L'attività solubilizzante dei microrganismi sui fosfati insolubili è stata invece indagata e dimostrata; in particolare si possono ricordare le esperienze di Perotti e di Verona e Luchetti (7).

La sospensione così ottenuta aveva la seguente composizione sommaria:

residuo secco a 100°	1.06%
Sost. umica - % residuo secco	64.7
» minerali » » »	35.3
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> » » »	1.3

Per l'insufficiente durata della sedimentazione dell'estratto ammoniacale, il complesso non risultò del tutto privo di argilla, ma questa impurità non poteva avere alcuna influenza sui processi oggetto d'indagine.

La sospensione venne distribuita in Erlenmeyer a fondo largo della capacità di cc. 500, nella quantità di cc. 200 per ognuno. Si allestirono poi 5 prove in doppio mediante le seguenti aggiunte:

N. 1	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2 ‰;	
N. 2	»	»	glucosio 2 ‰
N. 3	»	»	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 1 ‰
N. 4	»	»	glucosio 2 ‰ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1 ‰
N. 4	»	»	glucosio 2 ‰ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1 ‰
N. 5	»	»	toluolo 1 ‰ (controllo).

Qualche grammo di terra venne quindi trattato con 20 cc. di acqua sterile: dopo agitazione e deposizione della parte sabbiosa, si decantò il liquido e, addizionandone 1 cc. in tutte le prove, si provvide a inoculare nei singoli substrati i microrganismi del terreno.

I matracci vennero mantenuti a temperatura ambiente (22-25°) ed al buio per due mesi. Ad eccezione delle prove di controllo, si poté osservare dopo alcuni giorni, lo sviluppo di qualche vegetazione ifomicetica superficiale; nelle prove N. 2 e 4, inoltre lo svolgimento di bollicine di gas. Mano a mano sul fondo di tutti i matracci si veniva raccogliendo un sedimento che nelle prove di controllo appariva come semplice deposito di argilla; di simile aspetto era pure quello delle prove N. 3 (complesso addizionato di NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), mentre nelle rimanenti prove il sedimento stesso era di colore decisamente nerastro e perciò da ritenersi costituito, oltre che da argilla, da materia umica nera coagulata.

Trascorsi i due mesi, la determinazione del pH dei liquidi diede i seguenti valori:

N. 1	pH	7.8	
N. 2	»	7.85	
N. 3	»	7.85	(pH iniziale = 7.2)
N. 4	»	7.9	
N. 5	»	6.65	

Si osserva subito che nella prova di controllo si ebbe una diminuzione del pH, imputabile con molta probabilità a fenomeni puramente chimico-fisici, dato che per la presenza di toluolo ogni azione microbica era da ritenersi del tutto inibita. Nelle altre 4 prove si ebbe invece una decisa alcalinizzazione, molto probabilmente per formazione di ammoniaca da parte dei microrganismi sviluppatasi a spese della sostanza umica.

Dovendo accertare se le azioni microbiche avevano o no modificato la stabilità delle combinazioni fosforate e dato che, nonostante il sedimentato formatosi, il complesso colloidale era ancora per la massima parte in istato di dispersione, è parso opportuno procedere alla flocculazione del complesso medesimo mediante leggera acidificazione, per poi determinare la concentrazione dell'anidride fosforica nel liquido limpido, facilmente separabile per filtrazione. A tal fine si procedette nel seguente modo: dai singoli matracci si sono prelevate quattro frazioni di 25 cc. esatti, cui si addizionarono quantità diverse, stabilite con alcuni saggi preliminari, di  $H_2SO_4$ , 0.1 N e di acqua distillata, in modo di realizzare per i complessi colloidali delle 5 prove condizioni di pH il più possibile prossime e da portare contemporaneamente a 40 cc. il volume totale del liquido. Si lasciò in riposo per circa due ore, si separò il liquido limpido per filtrazione e si procedette infine alla determinazione esatta del pH e dei contenuti in anidride fosforica <sup>(1)</sup>. Non sono emerse che lievi differenze in rapporto al grado di acidificazione con cui venne precipitato il complesso colloidale nelle singole prove, cosicchè i contenuti in anidride fosforica determinati sui liquidi possono con tutta tranquillità essere assunti come indici del grado di mobilizzazione del fosforo legato ai rispettivi complessi colloidali.

I dati ottenuti si possono quindi riassumere nelle seguenti cifre, in cui si è fatta pari a 100 la concentrazione dell'anidride fosforica nel liquido separato dalla prova di controllo, desunte dalle determinazioni sui liquidi aventi lo stesso pH:

Da questi dati si deduce agevolmente che le azioni microbiche svoltesi a spese della sostanza umica, oltre che del glucosio nelle prove N. 2 e 4, hanno influito in senso decisamente positivo, come fattore determinante la mobilizzazione dell'acido fosforico del complesso umico-minerale.

Interessanti sono pure le differenze che si possono osservare fra le diverse prove di solubilizzazione; infatti la più accentuata influenza dell'intervento microbico si ebbe nella prova N. 2, in cui al complesso umico-minerale venne addizionato il 2% di glucosio; effetto un po' meno intenso esplicarono i microrganismi nella prova N. 4, in cui, oltre al glucosio, venne addizionato l'1% di nitrato ammonico. Analogamente, maggior influenza si ebbe nella prova N. 1, in cui non venne fatta alcuna aggiunta di sostanze nutritive per i microrganismi, che non nella N. 3 in cui venne addizionato l'1% di nitrato ammonico. Si può così dedurre che mentre il glucosio ha influito in senso positivo, il nitrato am-

---

<sup>(1)</sup> Per le determinazioni della anidride fosforica venne applicato il metodo colorimetrico di Briggs (Jour. of biol. Chem. 1933, 53, 13).

monico ha esplicato un'influenza negativa; ne deriva che molto probabilmente l'azione dei microrganismi sulla mobilizzazione dell'acido fosforico del complesso si è verificata specialmente in seguito alla utilizzazione della sostanza unica quale fonte di azoto.

Per una più efficace interpretazione dei risultati ottenuti, giova tener presente che, dato il carattere eminentemente ossidativo della degradazione cui soggiacciono le sostanze umiche nel terreno agrario, la degradazione stessa procede indubbiamente più intensa e profonda che non nelle condizioni delle esperienze descritte. In complesso quindi si può ritenere che la mobilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del suolo abbia luogo, non soltanto attraverso fenomeni fisico-chimici, ma anche ed in larga misura per effetto delle azioni microbiche sulle sostanze umiche. Perciò la funzione della microflora terricola appare di grande importanza pure nei confronti diretti della nutrizione fosforata della vegetazione.

#### OSSERVAZIONI SUGLI AGENTI MICROBICI DECOMPLEMENTI LE SOSTANZE UMICHE

Allo scopo di confermare meglio l'influenza delle azioni microbiche nei processi di solubilizzazione dell'acido fosforico legato ai complessi umico-minerali del terreno agrario ed anche per poter eventualmente riconoscere a quali microrganismi sia da attribuire sotto questo aspetto un'importante funzione, è parso utile effettuare alcune osservazioni sulla micro-flora sviluppatasi nei substrati delle esperienze sopra descritte. L'esame microscopico dei substrati medesimi permise di constatare che nel corso dei due mesi, al termine dei quali venne accertata la solubilizzazione dell'acido fosforico, s'era avuto un considerevole sviluppo microbico; in tutti i quattro materiali si osservò infatti la presenza di germi diversi: bastoncini, isolati oppure in brevi catene e di differenti dimensioni; forme rotonde ed ovali; batteri sporificanti e spore; filamenti di vario spessore, continui o settati. Evidenti differenze furono inoltre riscontrate fra i singoli substrati; così, in quelli delle prove N. 2 e 4 si poterono osservare degli ammassi costituiti da numerosi piccoli batteri, molti dei quali per le ridotte dimensioni e per la non omogenea colorazione del protoplasma avevano in un certo qual senso l'aspetto di diplococchi; microrganismi dello stesso tipo ma isolati erano però presenti in tutti i quattro substrati.

Per quanto precede è evidente che, data la presenza di una flora microbica assai mista, l'esame microscopico non potè fornire alcun indizio sicuro in merito alla natura degli agenti microbici più attivi nella degradazione della sostanza unica. Tuttavia, a qualche utile indicazione era ancora possibile pervenire attraverso l'identificazione dei microrganismi capaci di più intenso sviluppo sul substrato umico in condizioni spiccatamente aerobiche, cioè in condizioni più prossime a quelle in cui si svolge la vita microbica nel terreno agrario. A tal fine si è operato nel seguente modo: la sospensione umico-minerale della prova di controllo, venne sottoposta ad eliminazione del toluolo, quindi distribuita in scatole Petri

e solidificata con agar all'acqua distillata; si trapiantarono quindi per striscio i microrganismi presenti nei substrati delle precedenti ricerche e si mantenne in termostato a 30°. Dopo pochi giorni, in corrispondenza delle linee di semina venne osservata la formazione di tenue patina, avente una leggera tendenza ad espandersi; oltre a qualche banale vegetazione ifomicetica, nelle piastre seminate col materiale delle prove N. 2 e 4 si constatò inoltre la formazione di alcune piccole colonie giallo grigiastre, rilevate, umide, che continuarono a crescere sino a raggiungere un diametro di circa 2 mm. Furono allestiti diversi preparati dal cui esame microscopico emerse che la microflora sviluppatasi era costituita per la massima parte da microrganismi simili ai corti batteri che, isolati o riuniti in ammassi, erano stati osservati direttamente nelle sospensioni umico-minerali; in proporzioni decisamente minori figuravano bastoncini di maggiori dimensioni dei precedenti ed alcune altre forme microbiche.

Ottenuto nel modo anzidetto un buon arricchimento degli schizomiceti capaci di maggior sviluppo a spese della sostanza umica, si sono allestite delle piastre di isolamento per diffusione, impiegando i due seguenti terreni che permisero di raggiungere perfettamente lo scopo:

a) Succo di letame (ottenuto per spremitura e filtrazione da letame maturo, neutralizzato con  $H_2SO_4$  sino a  $pH = 7,3$  e sterilizzato a  $115^\circ$  per 20') - egual volume di agar al 2,5 %;

b) glucosio g. 5; fosfato monopotassico g. 0,5; solfato di magnesio 0,25; cloruro di sodio 0,25; solfato ferroso 0,01; nitrato ammonico 1; carbonato di calcio 1; agar 12,5; acqua distillata 1000; idrato potassico 0,1 N. sino a  $pH = 7,3$ .

Delle colture pure così ottenute si è quindi iniziato lo studio; in attesa di completare queste indagini ed esporne i risultati in una prossima nota, è interessante far notare sin da questo momento che, tanto dal punto di vista morfologico quanto per diversi caratteri colturali, alcuni dei germi isolati sono apparsi molto simili ai microrganismi che nel corso di altre ricerche erano stati riconosciuti come simbiotici stabili in colture di citofaghe su cellulosa (8). Questa constatazione, che ulteriori osservazioni in corso dimostrano in modo sempre più evidente, appare di un certo interesse, in quanto si ricollega al quesito, tuttora controverso (1), della formazione e della composizione dell'humus e concorre

---

(1) Infatti mentre alcuni Autori sostengono che gli acidi umici derivino dalla lignina, altri ritengono che essi si formino essenzialmente dalla cellulosa, però entrambe le ipotesi sono basate principalmente sulla formazione di acidi umici sintetici, simili a quelli naturali, a partire rispettivamente da idrati di carbonio (per azioni di acidi o di alcali a caldo) e da composti fenolici (per ossidazione alcalina). D'altra parte dalle ricerche di Hutchinson e Clayton e da quelle di Winogradsky risulta che la sostanza gelatinosa, derivante quale prodotto stabile dall'azione cellulolitica delle citofaghe, è dotata di molte proprietà comuni a quelle delle sostanze umiche. Lo stesso Winogradsky (9), anche attraverso altre considerazioni, attribuisce inoltre ai detti microrganismi una funzione importantissima come produttori di colloide organico del terreno.

La possibilità di formazione biologica di sostanze umiche dagli idrati di carbonio risulta pure dalle ricerche di Quilico (10) il quale ha dimostrato che l'aspergillina prodotta dall'*Aspergillus niger* a partire da un idrato di carbonio, presenta una grande analogia di proprietà fisiche, di composizione e di comportamento chimico con gli acidi umici naturali.

a far ritenere che i colloidali umici del suolo siano effettivamente costituiti, ed in proporzioni forse cospicue, anche da sostanze derivate dalla degradazione della cellulosa ad opera delle citofaghe.

Particolarmente significativo in questo senso è stato l'esito di alcune prove di coltura che si sono effettuate trapiantando su cellulosa (piastre secondo Winogradsky) i germi sviluppatasi nelle piastre con sostanza umica di cui si è detto più sopra; infatti alcuni trapianti hanno dato luogo a debole attacco della cellulosa. I rilievi compiuti consentono quindi di scorgere uno stretto legame di funzioni fra i microrganismi isolati e quelli più strettamente specifici che presiedono alla prima fase di decomposizione della cellulosa nel terreno agrario. Pertanto il proseguimento delle ricerche potrà estendere utilmente le nostre conoscenze sull'interessante argomento.

#### RIASSUNTO

Le ricerche compiute dimostrano che nella mobilitazione del fosforo legato ai complessi colloidali del terreno agrario (complessi costituiti da sostanza umica, silice, alluminio, ferro ed acido fosforico) presiedono anche le azioni microbiche di degradazione delle sostanze umiche.

È pure risultato che come agenti microbici particolarmente attivi nei processi di decomposizione delle sostanze umiche del suolo vanno considerati alcuni schizomiceti che, isolati in coltura pura, sono apparsi simili a germi che in altre ricerche furono riscontrati presenti come simbiotici di citofaghe su cellulosa.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die hier beschriebenen Untersuchungen beweisen, dass an der Mobilisierung des an kolloide Komplexe des Erdbodens gebundenen Phosphors (Komplexe die aus Humussubstanz, Kieselerde, Aluminium, Eisen und Phosphorsäure gebildet sind) mikrobiische Abbauungen der Humussubstanzen beteiligt sind.

Aus diesen Untersuchungen tritt ausserdem hervor, dass bei den Abbauprozessen der Humussubstanzen des Erdbodens einige Schizomyceten als besonders tätige Agentien zu betrachten sind. In Reinkultur isoliert, sehen dieselben den Mikroorganismen ähnlich, die bei früheren Untersuchungen auf Zellulose, als Symbionten der Cytophagen, aufgefunden worden sind.

#### BIBLIOGRAFIA

(1) *C. Antoniani* - Sui complessi colloidali del suolo.

Nota I (Rend. R. Ist. Lomb. di Sc. e lett. 1930. 63, fase. II-V )

Nota II ( » » » » » 1931. 64, » XI-XV)

Nota III ( » » » » » 1932. 65, » I-V)

Nota IV ( » » » » » 1932. 65 » XI-XV)

*C. Antoniani* e *I. Politi* - Sui complessi colloidali del suolo. Nota V (Rend. R. Ist. Lombardo di Scienze e Lettere 1933, 66, fasc. I-V).

(2) *I. Politi* - Sui complessi colloidali del suolo. Nota VI. Sulle combinazioni colloidali organo-fosforate del terreno. (Rend. R. Ist. Lombardo di Sc. e Lett. 1933, 66, fase. I-V).

(3) *B. Tacke* - Neue Beitrage zur Chemè der Humusböden (Chem. Zeit. 1756, 19, 2°).

(4) *Van Bemmelen* - Die Absorptionverbindungen und das Absorptionvermögen der Ackererde (Landwirtsch. Vers. Stat. 1888. 35).

(5) *P. L. Hibbard* - Soil Sci., 1931-39, 337-359.

(6) *E. Castellani* - Sulla liberazione per attività microbiologica del fosforo legato al complesso colloidale del suolo (Atti VI Congr. Naz. di Micr. Milano 1937, pag. 730).

(7) *R. Perotti* - Sul ciclo biochimico dell'anidride fosforica nel terreno. Roma, 1909.

*O. Verona e G. Luchetti* - La dissoluzione del fosforo per attività dei microbi della « rizosfera ». (Boll. del R. Ist. Sup. Agrario di Pisa 1931, 7).

(8) *I. Politi* - Alcune osservazioni sui microrganismi aerobi decomponenti la cellulosa - Tentativi di isolamento in coltura pura (in corso di stampa nel Boll. Sez. It. della Soc. Intern. di Microb.).

(9) *S. Winogradsky* - Etudes sur la microbiologie du sol. Sur la degradation de la cellulose dans le sol. (Ann. Inst. Pasteur 1929, 43 pag. 549).

(10) *A. Quilico* - I pigmenti neri animali e vegetali (Ed. Fusi Pavia, 1937).