

Lo studio della microflora terricola insediatasi sulle lave vesuviane del 1895 -1899

S. Riccardo

(Ricevuto il 12 aprile 1942-XX)

(Primo contributo)

Le specialissime condizioni in cui viene a trovarsi chi risiede nelle amene piaghe vesuviane — potendo disporre di un non comune campo di osservazioni costituito dalle pendici di un vulcano in piena attività — avevano già richiamato vari anni or sono (1-5) l'attenzione di questo Istituto per cercare di determinare l'esistenza o meno di una successione microbiologica nell'impianto delle principali specie interessanti la fertilità di un terreno agrario.

Poter seguire per molti anni tale successione sopra un substrato naturale, sicuramente sterile al momento della sua solidificazione (figg. 1 e 2), facendo esperienze *in situ*, in zone più o meno lontane da terreni coltivati, rappresenta certo uno dei casi più perfetti per il batteriologo agrario, ed il Vesuvio, colle sue frequenti eruzioni, permette di studiare sia il naturale ripopolamento delle lave, sia la macro e microflora provocata su di esse dalla mano dell'uomo.

«Ci sono delle località sul Vesuvio — scriveva Rossi (6) — in cui il contrasto fra la morte e la vita è affascinante e il Gran Cono lavico, brullo, scosceso, franante, su cui letteralmente non vegeta coll'espressione di Giacomo Leopardi *arbor nè fiore*, spicca assai spesso, gigante scheletrico, vicino ai verdi e profondi boschi del Somma o alle superbe pinete dell'incantevole declivio fra Sebeto e Sarno: mentre per chi ascende il Somma dal lato di S. Anastasia, lo spettacolo improvviso che si ha, uscendo dai boschi, dell'Atrio del Cavallo e della Valle dell'Inferno, su cui domina tragico il Gran Cono, nella sua dantesca apparenza, ci trasporta in un mondo che ha dell'irreale e in cui la vita è assente. Tutta la storia del Vesuvio è piena di questi contrasti di vita e di morte».

Le prime osservazioni compiute venti anni or sono non potevano essere che orientative, limitate a quello che permetteva la tecnica batteriologica di allora, la quale era ben lungi dall'incoraggiare simili studi con speranza di risultati molto utili.

Impossibile sarebbe stato, anche, sorprendere i primi albori della flora microscopica perchè, pur avendo il Vesuvio (dopo un periodo di calma assoluta che durò dal 1906 al 1913) ripreso lentamente la sua attività, la stazione del cratere nell'interno del cono non rendeva agevole prelevare dei campioni di lave recentissime, ed anche se ciò fosse stato

possibile, la permanenza delle lave nell'interno del cono ne avrebbe menomato assai il valore rispetto a un'invasione microbiologica. Per tali ragioni nelle prime esperienze, piuttosto che ricercare solamente ed obiettivamente le singole specie presenti, si cercò di dare la precedenza allo studio di uno dei processi microbiologici fra quelli ritenuti più importanti in ogni terreno, e precisamente s'incominciò col determinare la distribuzione degli azotofissatori nei terreni vesuviani di varia altitudine, concludendo che, mentre nei terreni agrari vesuviani inferiori ai 300 m. di altezza, i fissatori di azoto anaerobici, tipo *B. amylobacter*, sono sempre presenti, già ad una altezza superiore, almeno in alcune stagioni dell'anno, possono essere assenti.



Fig. I. - Lave che poco alla volta si ricoprono di vegetazione spontanea.

Presenti dichiarammo anche, o assenti parallelamente agli anaerobici, gli azotofissatori aerobici, tipo *Azotobacter*. In quanto a questi ultimi, fu merito del nostro Istituto averli isolati e studiati per primo nel Mezzogiorno d'Italia. In un nostro contributo del 1924 (4), mercè uno studio accurato morfo-biologico seguito su portaoggetti riscaldabile del Pfeiffer, partendo da colture monocitogenetiche, mettemmo anche in rilievo l'assenza di un accentuato polimorfismo dell'*Azotobacter chroococcum* Beij.,

come fino allora avevano preteso Löhnis e Smith (7-8). E, a convalidare il nostro asserto, intervenne due anni dopo, nel 1926, la memoria di Winogradsky (9), il quale, a proposito del pleomorfismo eccessivo attribuito dai suddetti autori agli azotobatteri, così si esprimeva:

« Il est curieux que ce fait banal, mal compris, ait été le point de départ d'une théorie extravagante, dénuée de tout fondement expérimental, selon laquelle l'Azotobacter, et à sa suite les espèces bactériennes en général, passeraient par un cycle évolutif extrêmement compliqué, comprenant une variété de formes bacillaires, filamenteuses, sporogènes, et plusieurs autres encore insoupçonnées ».

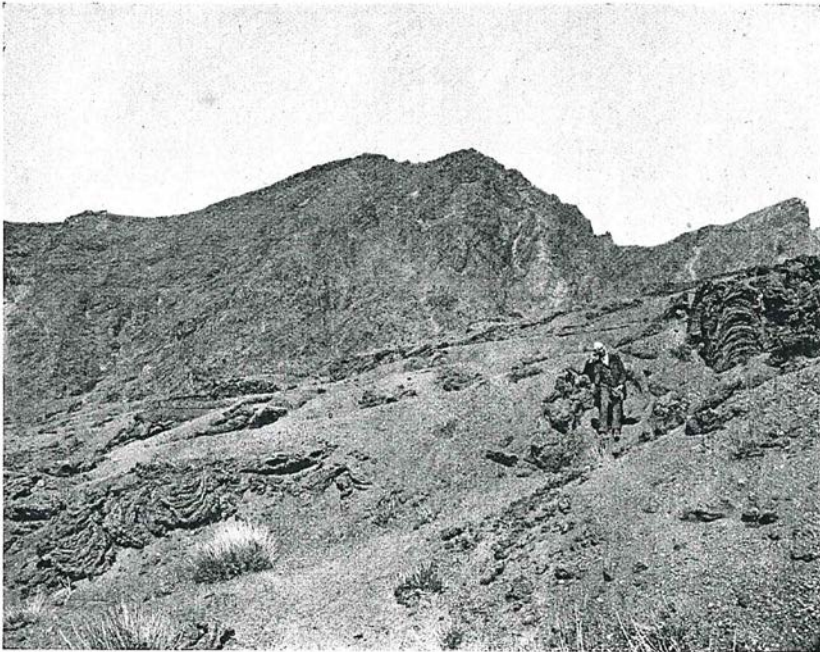


Fig. 2. - Lave sterili, lapillo, cenere e... *Spartium junceum*.

Abbiamo detto che le nostre prime osservazioni di venti anni or sono furono limitate a quanto la tecnica batteriologica di allora poteva offrirci. Infatti, solo nel 1925, incominciò l'alba di una nuova era nello studio microbiologico del terreno agrario coi magistrali lavori di Sergio Winogradsky (10-22) il quale, tenendo conto anche delle osservazioni di Conn (23) sull'uso dei colori acidi (*) per l'esame microscopico diretto del suo-

lo, creò tutta una nuova tecnica che, se pur non ha ancora dato tutti quei risultati che il microbiologo pedologo vorrebbe presto raggiungere, ha dato indubbiamente un forte impulso ad una nuova concezione di studi. E i risultati finora ottenuti non sono stati certo trascurabili! Una numerosa schiera di studiosi ha cercato, in questi ultimi quindici anni, di perfezionare sempre più tali metodi di studio, tendenti non solo ad avvicinarci il più possibilmente, nella sperimentazione, alle condizioni di vita dei microrganismi nel terreno agrario, ma anche ad osservare direttamente al microscopio tutta la microflora e microfauna terricola nel suo ambiente naturale, determinandone perfino il numero, e, possibilmente, le specie.

In tal senso hanno sperimentato Conn (24-29), Rossi e Riccardo (30-32), Riccardo (33-34), Koffman (35-37), Cholodny (38), Jadwiga Ziemiecka (39-41), Dianowa e Woroschilowa (42), Demeter (43-44), Kubiena (45-48), Jensen (49), Rossi e Gesuè (50), Rossi e Wang Tsu-Kao (51), Wang Tsu-Kao e Chih-San Chia (52), Stille (53), Starkey (54), Winnik e Goldberg (55), Waksman, Cordon e Hulpoi (56), e molti altri.

In merito alle osservazioni compiute dai vari Autori, meritano una particolare attenzione quelle di Dianowa e Woroschilowa, che, avendo isolato da terreni coltivati alcune specie batteriche morfologicamente assai vicine all'*Azotobacter*, ma sprovviste di potere azotofissatore, richiamano l'attenzione dei microbiologi agrari a non essere tratti in inganno dal semplice esame microscopico diretto nello studio qualitativo e quantitativo degli azotobatteri.

Kubiena mette, inoltre, in particolare rilievo l'uso dei metodi «micro-pedologici» raccomandando, per l'osservazione, il cosiddetto «microscopio da terreno» fatto costruire su designazione dell'autore dalla Ditta Reichert di Vienna.

«Da die Plattenmethode - conclude Kubiena - imstandè ist, einen «Grossteil aller im Boden (entwickelt und unentwickelt) vorhandenen «Organismenarten in einem einzigen bequemen Arbeitsgange zu bestimmen, wird sie stets ein unentbehrliches Hilfsmittel im Dienste der mikro-«biologischen Bodenuntersuchung bleiben. Die direkten Methoden treten «ihr indes als ein heute bereits unerlässliches Ergänzungsverfahren zur «Seite».

In ciò siamo perfettamente d'accordo con Kubiena, perchè se il metodo classico delle piastre rappresenta un comodo sistema per poter isolare e studiare gran parte delle specie microbiche esistenti nel terreno, non si può fare a meno dei metodi diretti (complementari dei primi) e di altri metodi che ci avvicinino il più possibilmente alle condizioni naturali, per poter studiare quei microrganismi che o non si sviluppano affatto o modificano sensibilmente i loro caratteri morfo-biologici nei substrati agarizzati finora adoperati.

*) E' noto come i colori acidi, pur differenziando bene le forme vegetative, non esercitano alcun effetto sulle spore e sulle sostanze colloidalì del terreno. E' già questo un notevole risultato permettendo di poter constatare la presenza di microrganismi nel loro stato di piena attività, che è quello che interessa maggiormente. Le spore non rappresentano che facoltà potenziali, di cui si terrà il debito conto in determinate esperienze.

La vegetazione sulle lave del 1895-99.

La località da noi presa in esame nel presente contributo è stata la zona bassa del Colle Umberto, il quale sorse coll'eruzione del 1895-99. Questo Colle (che ha soli 42-46 anni di vita, poco distante dal Colle Canterani dove travasi l'Osservatorio, ed alto m. 888 sul livello del mare) ebbe la sua superficie interamente coperta dai prodotti dell'eruzione del 1906 e soprattutto dalla cenere, che in parte venne trasportata dal vento e dall'acqua, ed in parte andò a colmare le minime anfrattuosità della lava facilitando in tal modo lo sviluppo delle piante inferiori e superiori che erano andate perdute.

Molti licheni ricoprono larghe zone di roccia messa a nudo dalle precipitazioni atmosferiche. Secondo Comes (57) la forma alveolata e scoriacea delle lave affretterebbe lo sviluppo dei licheni, perchè tale stato della superficie della roccia rende più lunga la permanenza dell'acqua su di essa, agevolando così la moltiplicazione delle alghe unicellulari e la formazione dei licheni. Licopoli (58) riferisce che « le alghe e i licheni si contendono la priorità ». Fra i licheni, quello che è maggiormente diffuso e che si mostra per primo, è il lichene cespitoso, cioè lo *Stereocaulum vesuvianum* Pers. (*S. botryosum* var. *vesuvianum*, Ach.) di colore cinereo, alto qualche centimetro. Secondo Comes, sulle lave eruttate da qualche anno non è possibile rinvenire alcuna traccia di vegetazione, all'infuori di uno scarso accenno di Alghe unicellulari, non escluse le Diatomee. La vegetazione lichenica si presenterebbe più tardi, e, secondo lo stesso Licopoli, verso il settimo anno dell'età della lava. Lo sviluppo più o meno rapido di tal lichene dipenderebbe inoltre dallo stato relativo della levigazione o della anfrattuosità della superficie lavica, ed anche dal grado di compattezza e di decomposizione della roccia.

Sul Colle Umberto, però, oltre ai Licheni, che a dozzine di specie popolano e adornano le lave, ai Muschi (*Bryum*, *Phascum*, *Grimmia*, *Bartramia* e tanti altri che formano zolle e cotenne più o meno fitte), alle Epatiche (*Jungermannia compacta* e *J. complanata*, le quali, col loro esteso sviluppo, oltre ad aumentare la superficie inerbata, fissano il detrito lavico già formato impedendo il dilavamento della roccia colle precipitazioni atmosferiche), si riscontrano, specie nelle cripte ombrose ed umide, la piccolissima Felce denominata *Cymnogramme leptophylla*, l'*Adiantum Capillus Veneris*, altre Felci più rustiche e meno esigenti di ombra (*Cheilanthes odora*, *Ceterach officinarum*, *Polypodium vulgare*, *Asplenium Tricomane*, *A. Adiantum nigrum*), nonchè molte Fanerogame, che rinverdiscono soprattutto i punti più soleggiati. Numerose sono le piante di *Centranthus ruber*, di *Sedum rufescens*, di *Scrophularia canina*, di *Helichrysum litoreum*, di *Rumex bucephalophorus*, di *Reseda fruticulosa*, ecc.

Nè mancano esemplari di Graminacee, rappresentati dalla *Poa bulbosa*, dall'*Aira Cupuniana*, dal *Corynephorus articulatus*, dalle *Festuca ciliata* e *F. bromoides*, dall'*Hordeum leporinum*, dalla *Poa annua*, dal *Phleum Michellii*, dal *Triticum repens*, dall'*Andropogon hirtum*, ecc...

Fra le piante legnose e legnose, in primo luogo è da ricordare lo *Spartium junceum* (la ginestra odorata contenta dei deserti), e poi la Ro-

binia Pseudo-Acacia, il *Populus alba*, l'*Alnus cordata*, e molti esemplari di *Pinus Pinea* e di *Pinus nigricans*, che la Milizia Forestale da vari anni, con encomiabile fervore, sta collocando a dimora un po' dappertutto sulle pendici del Vesuvio, e di cui molti esemplari sono già bene sviluppati ed alti oltre due metri.

I metodi seguiti per lo studio dei microrganismi anabolici e catabolici.

Lo studio delle varie categorie microbiche fu esteso, oltre che ai microrganismi anabolici (fissatori d'azoto e nitrificanti) e ai catabolici (denitrificanti, putrefacenti, degradatori della cellulosa), anche alla eventuale presenza di invisibili o ultramicroscopici.

In quanto alla tecnica seguita abbiamo tenuto conto dei recenti contributi dei vari Autori, tendenti a completare e perfezionare i primi metodi di Conn e di Winogradsky.

Per lo studio dei fissatori di azoto, oltre alle piastre di silico-gel usate da Winogradsky, si è adoperato il metodo per diluizione di Hiltner e Störmer (59), che per gli azotofissatori (sia aerobici che anaerobici) risponde benissimo, data la facilità con cui questi microrganismi possono svelarsi in appropriati substrati elettivi. Infatti, la soluzione di Beijerinck, distribuita in tubi e insemata con diluizioni progressive di terreno, dopo un mese a 28° C. in presenza di azotobatteri, dà sempre il tipico anello formato dal pigmento bruno fino a nero, sulle pareti del vetro, in corrispondenza della superficie del liquido. E l'esame microscopico dà la piena conferma che si tratti dell'*Azotobacter*, come anche le determinazioni chimiche col Kjeldahl (fatte colle stesse soluzioni, prive di azoto combinato, e distribuite in Erlenmeyer anziché in tubi) hanno sempre dato la prova della fissazione dell'azoto libero atmosferico rispetto ai controlli, usando tutti gli accorgimenti consigliati per tali determinazioni (60-62).

Lo stesso valga per i fissatori di azoto anaerobici, tipo *B. amylobacter* Bredemann. Questi microrganismi, coltivati in tubi contenenti tasselli di patata ed acqua, danno sempre abbondante formazione di schiuma in superficie del liquido, accompagnata dal caratteristico odore di acido butirrico, e, al microscopio, col semplice preparato a fresco fatto in una goccia di soluzione di Lugol, nelle prime 48-72 ore di termostato (cioè prima della sporificazione) sono sempre svelabili mercè la loro colorazione totale o parziale in bleu-viola.

Le numerose ricerche compiute dal nostro Istituto sulla microbiologia del suolo (fra l'altro, per ben nove anni — dal 1927 al 1935 — abbiamo studiato l'azione dei vari tipi di lavorazione del suolo agrario sui microrganismi terricoli nel Campo sperimentale di Cerignola (63)) hanno confermato la bontà del metodo di Hiltner e Stormer per la determinazione soprattutto degli azotofissatori, i cui risultati debbono ritenersi non meno esatti di quelli che si ottengono coi granelli di terra in piastre di silico-gel, o con uno qualsiasi degli altri metodi proposti, fra quelli elencati nella tabella I, per lo studio delle attività funzionali microrganiche.

Tab I.

Modo di valutazione delle attività funzionali microorganiche	Classifica dei metodi	Substrato nutritivo adoperato	Principali autori che hanno messo in pratica i vari metodi
Determinazione numerica dei microrganismi specifici presenti	Diretti	Soluzione nutritiva	Hiltner e Störmer Löhnis Millard Cutler (Scuola di Rothamsted) Rossi e Riccardo Wilson Lewis De Rossi
Valutazione chimica ponderale dell'attività funzionale dei microrganismi specifici		Terreno settico	Lipman e Brown Waksman Christensen Fischer Remy e Rösing Stevens e Whitters
		Soluzione nutritiva	Remy Löhnis Barthel Buhlert e Fickendey Perotti
	Speciali	Silico-gel imbevuto di soluzione nutritiva	Winogradsky Curie

Il metodo di Hiltner e Stormer (59) – che si può considerare, d'altronde, una derivazione diretta dei metodi di Luigi Pasteur – è stato applicato con successo da Löhnis (64), da Millard (65), da Wilson (66), da Lewis (67), nonché da Cutler (68), che lo ha adoperato anche per determinare il numero dei protozoi attivi nel terreno. Anche De Rossi (60), per determinare il numero dei microrganismi specifici del terreno, non esita a consigliare di «*sostituire la silice gelatinosa coll'agar semplice, e di eseguire la semina delle piastre non coi grani di terra ma con sospensione di terra di progressivamente crescente diluizione*».

Ma, data la grande importanza che può assumere questa categoria di microrganismi (che, d'ordinario, si riscontrano in numero piuttosto scarso nei terreni agrari) se riesce ad insediarsi in terreni sterili in via di formazione agraria, abbiamo adoperato, inoltre, le *piastre molate* di Winogradsky, nonché il nostro dispositivo (33) per cercare di ottenere culture elettive di azotobatteri. Nè abbiamo ommesso di eseguire alcune ricerche su piastre di terreno artificiale, che, in precedenti esperienze (34), ci avevano dato risultati soddisfacenti per lo studio di altri microrganismi.

La metodica seguita per lo studio dei nitrificanti è stata quella dei granelli di terra in piastre di silico-gel, e, parallelamente, quella per diluizione, adoperando grandi Erlenmeyer con piccole dosi di soluzione di

Barthel (69). In quanto ai *nitrificanti*, non ci stancheremo mai di ricordare (70) le difficoltà che s'incontrano, sia per isolarli che per differenziare quantitativamente i nitrici dai nitrosi. Pertanto, non possiamo accontentarci che con riserva i risultati di quegli Autori che pretendono di dare delle cifre per i *batteri nitrici*.

Allo stato attuale delle nostre conoscenze, per la determinazione dei nitrificanti (nitrosi+nitrici), bisogna convenire che: o si tien conto dei soli risultati forniti dai *centri di densità dei batteri nitrosi* intorno ai granelli di terra collocati sulle piastre di silico-gel (allestite secondo le istruzioni di Winogradsky), o saranno le sole determinazioni chimiche (col reattivo di Trommsdorf, alla difenilamina solforica) ad indicare la completa ossidazione del *solfato ammonico* fino al termine *nitrate*, com'è per la soluzione di Barthel, insemata con sospensioni di terreno a crescente diluizione.

Lo stesso Winogradsky, d'altra parte, ammette quanto noi sosteniamo: l'illustre Maestro così scrive a pag. 422 della sua settima memoria (17) sugli « organismi della nitrificazione »:

« Le procédé, comme il a été déjà indiqué, ne vise que les microbes « de la nitrification qui sont tenus répondre du phénomène entier. En effet, « à l'encontre des idées qui paraissent encore en cours, c'est la nitrification « qui prime le phénomène, tant au point de vue physico-chimique (libération de l'énergie, taux d'oxygène entré en combinaison, etc.) qu'au point « de vue microbiologique. La nitrification n'est qu'une sorte d'annexe, de « complément nécessaire et assuré de la première phase. Aussi, le fait que « les microbes de la nitrification sont très malaisés à repérer, et leur densité « impossible à évaluer, n'empêchera pas le procédé de fournir des résultats « d'une exactitude suffisante pour le but proposé ».

Se a ciò si aggiunge il fatto che per l'allestimento delle piastre destinate allo sviluppo dei batteri nitrici occorrono sali puri di nitrito di sodio o di potassio, *essenti da nitrati* (il che è molto difficile, quando si pensi che in nostre precedenti esperienze (70) anche il nitrito di sodio purissimo di Kalbaum diede la reazione dei nitrati, per cui concludemmo che molte - se non tutte - delle esperienze eseguite finora sui *batteri nitrici* dovrebbero forse essere sottoposte a revisione!) è evidente come appaia ben giustificato il dubbio che non tutte le colonie sviluppantisi su agar nitrato o su silico-gel nitrato debbano attribuirsi senz'altro ai soli batteri nitrici!

E lo stesso Winogradsky (17), parlando del genere *Nitrobacter*, ammette lo sviluppo di germi banali:

« D'après les anciennes observations, l'espèce - Egli scrive - est cultivable sur la gélose nitrifiée. Nous préférons l'emploi du silico-gel nitrifié, « milieu plus favorable pour les nitrificateurs et dont les propriétés de sélections écartent plus complètement la souillure avec germes banaux.

« Ajoutons qu'en étudiant différents échantillons de sol, on est tombé « sur un microbe qui lui ressemblait par ses cellules en coin, mais qui « formait des *Kystes* à l'instar de *Nitrosocystis*. Malheureusement, la culture de ce microbe que l'on a dénommé *Nitrocystis* a été bientôt perdue. « Il y aurait à rechercher, ne serait-il pas l'agent de nitrification spécialement

« adapté aux sols forestiers, comme c'est le cas pour le *Nitrocystis*: recherches recommandées à ceux qui étudient spécialement ces sols ».

In quanto allo studio dei microrganismi catabolici, mentre per i putrefacenti e per i denitrificanti si è seguito il metodo per diluizione, secondo Hiltner e Störmer (soluz. di Giltay per i denitrificanti (69) e soluz. all'1,5 % di peptone per gli ammonizzanti o putrefacenti), per i degradatori della cellulosa si sono adoperati, oltre al metodo di Winogradsky delle piastre al silico-gel (14), anche due metodi elaborati nel nostro Istituto:

1) Interramento del nostro dispositivo (33) per colture elettive, da noi altre volte adoperato per i microrganismi del gruppo « *Cytophaga* » (71);

2) piccole Erlenmeyer, della capacità di 100 cc., nel cui fondo si poneva un blocchetto di carbonato di magnesio, sul quale si adagiava orizzontalmente un dischetto di carta da filtro. In ciascuna Erlenmeyer, dopo sterilizzazione in autoclave a 120° C., si aggiungevano, colle dovute precauzioni dell'asepsi, cc. 3 della soluz. A e cc. 15 della soluzione B, sterilizzate precedentemente e separatamente:

Soluzione A: fosfato monopotassico gr. 1; solfato di magnesio gr. 0,5 cloruro di sodio gr. 0,5; solfato di ferro gr. 0,01; solfato di manganese gr. 0,01; carbonato di calcio gr. 2; acqua distillata cc. 200.

Soluzione B: nitrato di potassio gr. 4; acqua distillata cc. 1000.

La soluzione A corrisponde a quella consigliata da Winogradsky, colla variante che noi abbiamo aggiunto l'1% di CaCO₃. Winogradsky, invece, aggiunge una piccolissima quantità di CaCO₃ quando si tratta di preparare la soluzione per impregnare il silico-gel destinato alle colture elettive di citofaghe. Anche per il nitrato di potassio, c'è da osservare che noi abbiamo fatto una soluzione, mentre Winogradsky lo usa allo stato secco e in polvere, spargendolo sulla superficie del silico-gel.

Le piccole Erlenmeyer, tranne i controlli, venivano insemminate colle medesime diluizioni progressive di terreno usate per gli altri gruppi di microrganismi.

Tutte le Erlenmeyer (sia quelle destinate allo sviluppo dei nitrificanti che quelle destinate ai denitrificanti e ai degradatori della cellulosa) venivano incubate a 20° C.; i tubi di soluz. Beijerinck per gli azotobatteri si tenevano invece a 28° C., mentre quelli di patata e di soluz. di peptone si tenevano a 34° C.

Sulla temperatura di incubazione delle piastre e sul periodo di permanenza delle stesse in termostato, si seguivano le seguenti modalità: le piastre di silico-gel e quelle di terreno artificiale (preparate come si dirà avanti) si tenevano a 20° C. e in camera umida per un mese; le piastre di agar-brodo di carne (per la carica batterica ed actinomicetica) a 30° C. per quattordici giorni; le piastre di agar acido sintetico per gli eumiceti (pH = 4,0), preparato secondo Waksman (72), a 28° C. per tre giorni.

In quanto alla metodica « micropedologica », come la chiama Kubiena, abbiamo seguito innanzi tutto la tecnica adoperata dal nostro Istituto fin dal 1927, consistente essenzialmente in un dispositivo (fig. 3) destinato a reggere un porta-oggetti e permettere di poterlo calcare contro il terreno per portarne via l'impronta e con essa buon numero di microbi. In conclu-

sione si cerca di fare quello che in batteriologia si chiama un *preparato per impronta* ricavato da una colonia (*Klatsch-préparat* dei Tedeschi).

E si usa il « timbro » dopo avere spalmato il vetrino, pulito radicalmente, di liquido speciale, scartando l'agar, il quale possiede una flora ed una microfauna sua propria, e può inquinarsi, inducendo così doppiamente in errore; quindi si fissa col calore come fosse un preparato comune, si colora coll'eritrosina fenicata, aiutandosi col calore, si lava abbondantemente si asciuga.

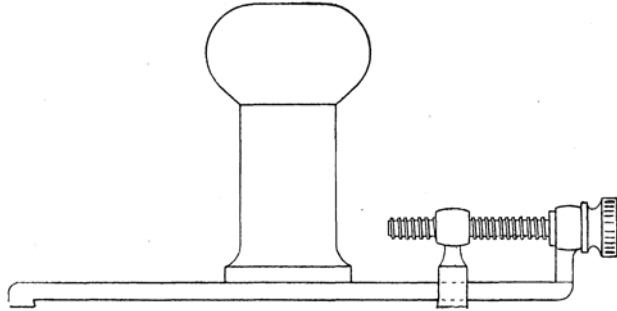


Fig. 3.

L'osservazione si può fare con un obbiettivo cercatore, salvo a controllare ed ingrandire quello che si vede, con obbiettivo ad immersione.

Oltre ai *preparati per impronta*, si è adoperato il metodo dei vetrini sepolti, noto col nome di Rossi-Cholodny (*), consistente nel seppellire nel terreno delle coppie di vetrini portaoggetti ben puliti con o senza sostanze spalmate, a seconda che si voglia influire con eventuali azioni chemiotattiche, ovvero si vogliono avere espansioni naturali (colonie) dei microbi sia dall'alto che dal basso ed allo stesso livello. In tal modo si può - usando l'espressione del Rossi - gettare uno sguardo reale e non metaforico nel contenuto batteriologico del terreno.

Alcune osservazioni sulla natura dei terreni agrari della zona alta vesuviana e sulle variazioni climatiche dell'annata 1941.

Le analisi più recenti che possediamo sulle terre vesuviane, o meglio, sulle terre giovani vesuviane (rocce che, pur avendo raggiunto un disfacimento più o meno spinto, non hanno per nulla modificato la loro composizione chimica) sono quelle di Bottini (73).

Basta un rapido sguardo ai numerosi dati riportati dall'A. per convincersi della grande ricchezza di questi terreni in elementi fertilizzanti.

*) In omaggio alla verità, è al Rossi che spetta la priorità di tale metodo. Infatti, mentre la pubblicazione del Rossi (30) è del 1927, quella di Cholodny (38) è del 1930! La priorità del Rossi venne in seguito riconosciuta anche da Conn, come appare dal seguente testo: « La memoria e l'estratto (scriveva il Rossi nel 1933 a pag. 261 bis del « lavoro Della attendibilità del « metodo Rossi » per la conta dei « glomeruli batterici » « del terreno agrario) erano già stampati quando ho ricevuto una lettera del Conn, che « riconosce giuste le mie osservazioni per ciò che lo concerne, dicendole cagionate da fatti « estranei alla sua volontà. Ringrazio sentitamente il Conn per la gentile lettera ».

Ciò che appare un po' strano nelle analisi è il valore del pH, che, su 52 determinazioni, è risultato di 6,0 fino a 6,4 in ben 15 campioni, mentre per i rimanenti ha oscillato fra 6,5 e 7,2.

«Sembra strano - scrive Bottini - come rocce così giovani, così ricche di basi, all'inizio ancora della loro decomposizione, e che, se per poco vengano a contatto con acqua, le impartiscono immediatamente reazione alcalina, solo per aver raggiunto un grado di disgregazione più o meno avanzata debbano avere reazione neutra, anzi, ancora di più, debbano tendere all'acidità».

Secondo Bottini, l'anomalia apparente dei valori della reazione sarebbe dovuta alla presenza dei costituenti organici. In questi terreni si fanno frequenti ed abbondanti letamazioni, dando luogo ad acidi organici, i quali agirebbero nel terreno come energici fattori di decomposizione e fisserebbero in combinazioni chimiche o di assorbimento i prodotti di tale decomposizione. Parte della loro acidità rimarrebbe però libera, e sarebbe appunto questa acidità quella che, comunicandosi all'acqua, si avverte coi mezzi di misura.

Sui terreni coltivati della zona alta Vesuviana avremo occasione di ritornare in seguito, non potendo non tener conto, in tutte le nostre esperienze, della grande influenza che può esercitare ai fini dell'insediamento della vita sulle lave sterili la vicinanza di campi o giardini, in cui ammiriamo il rigoglio di alberi vari, di vigneti ecc.

Così, il Colle Canteroni - dove travasi l'Osservatorio Vesuviano col giardino e l'Eremo - è poco distante dal Colle Umberto! Ma, mentre il Colle Canteroni fa parte dell'antica muraglia circolare del Somma, per cui i terreni intorno all'Osservatorio sono da considerarsi come *terre vecchie* del Monte Somma, il Colle Umberto è stato costruito in un periodo di appena quattro anni, coll'emissione di mc. 20.000.000 di lava.

I dati riportati da Bottini per il terreno che travasi nel recinto dell'Osservatorio Vesuviano, figurano nella Tab. II^a.

In quanto alla composizione delle lave del Vesuvio, queste, in tutte le eruzioni storiche, sono di natura assai simile, ma quasi mai identiche, anche in eruzioni assai vicine, come quelle del 1871 e 1872. Sono delle Leucotefriti con qualche Leucobasanite, formate essenzialmente dall'aggregamento di una infinità di cristalli di Leucite ed Augite (e Olivina nelle seconde) disseminate porfiricamente in una pasta grigio-scura o nerastra, apparentemente omogenea, risultante degli stessi minerali, più il Plagioclase, che non si presenta mai in cristalli grossi. Ordinariamente associati al Plagioclase, all'Augite, alla Leucite, ed, evidentemente, all'Olivina, si trovano in minor quantità Magnetite, Mica, Sanidino, Nefelina, mentre nelle cavità e nelle fenditure si rinvencono frequentemente Sodalite, Oligisto, e più raramente Haüyna, Granato e Apatite. Ordinariamente la Leucite e l'Augite si vedono ad occhio nudo disseminati nella lava, ma anche la pasta apparentemente omogenea di questa, vista sotto il microscopio, appare formata da un ammasso di microscopici cristalli dei minerali nominati, cementati insieme da una piccola quantità di materia vitrea. Secondo le antiche analisi del Fuchs, riportate dal Mercalli (74-75), la

TAB. II

Profondità	Atacco con HCl conc. e bollente solubili in HCl												Estratto citrico		Estratto acquoso		pH	Acqua igroscopica	Perda a fuoco	Humus	Azoto		
	Insolubile in HCl	Si O ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	Mn O	Ca O	Mg O	K ₂ O	Na ₂ O	CO ₂	SO ₃	P ₂ O ₅	K ₂ O	Na ₂ O	Residuo a 100	Cl							
cm.	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%				
0-20	71,058	0,190	11,543	4,225	tr.	2,870	1,350	4,870	2,930	0,292	0,110	tr.	3,187	5,254	0,022	0,162	0,063	0,001	6,3	0,920	1,010	0,94	0,106
40-50	62,789	0,340	14,845	4,720	tr.	4,480	1,104	4,850	2,817	0,255	0,042	tr.	2,561	3,785	0,019	0,024	0,051	0,001	6,1	1,370	1,400	1,24	0,118

TAB. III

Decade di osservazione	Gennaio		Febbraio		Marzo		Aprile		Maggio		Giugno		Luglio		Agosto		Settembre		Ottobre		Novembre		Dicembre	
	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.	mm. pioggia	Gradi C.
1 ^a decade	86,2	6,0	72,6	5,6	24,5	9,0	33,7	9,9	38,3	10,6	3,1	17,8	2,4	20,7	0,0	20,4	17,9	17,0	42,2	17,4	50,5	9,3	25,0	6,5
2 ^a »	62,1	5,2	27,7	8,3	38,7	6,1	17,7	7,8	71,5	11,5	8,2	14,1	0,0	21,9	0,0	21,7	15,0	15,1	64,5	12,0	85,0	12,2	21,5	7,4
3 ^a »	42,4	6,4	78,5	6,1	0,0	8,2	7,1	9,6	1,7	15,2	0,0	20,7	6,6	21,8	4,0	19,8	59,7	16,4	121,4	10,3	9,0	9,7	15,8	2,4
mm. pioggia caduta mese	190,7		178,8		63,2		58,5		111,5		11,3		9,0		4,0		92,6		228,1		144,5		62,3	

media composizione chimica delle lave vesuviane, dedotta da 32 lave diverse, è la seguente:

Silice	48,29
Allumina	19,55
Ossido e sesquiossido di ferro	10,94
Calce	9,38
Magnesia	4,13
Soda	3,29
Potassa	5,26

Totale 100,84

Un fattore di grande importanza, di cui va tenuto il debito conto in alcune delle nostre esperienze, è dato dalle precipitazioni meteoriche, le quali possono essere causa di profondi sconvolgimenti degli strati superficiali del terreno, con continui rimescolamenti di materiale eruttato e terra, modificando non poco il substrato su cui dovranno insediarsi gli infinitamente piccoli, la flora spontanea e le piane coltivate. Ma la pioggia, sul Vesuvio, si combina spesso con un altro fenomeno, l'emissione di gas, dando origine a precipitazioni speciali che prendono, per il loro effetto, il nome di *acque caustiche*.

Dai dati pubblicati dal Malladra (76) — che vanno, con notevoli lacune, dal 1863 al 1913 — risulta una media annua di mm. 748,7 di pioggia, con un massimo di mm. 1629 (nel 1907), ed un minimo di mm. 332 (nel 1909). I risultati del 1941 sulle precipitazioni atmosferiche e sulla temperatura dell'aria sono riportati nella Tab. III^a.

L'umidità relativa dell'aria raggiunge in estate 64-65 centesimi nelle ore più calde, per cui sono abbondanti le rugiade proprio quando difettano le precipitazioni. Per quanto riguarda l'annata 1941, si sono avute le seguenti cifre medie per decenni:

Gennaio: 79, 80, 83; Febbraio: 72, 79, 77; Marzo: 76, 65, 67; Aprile: 75, 74, 73; Maggio: 84, 79, 61; Giugno: 64, 71, 65; Luglio: 54, 64, 65; Agosto: 67, 60, 74; Settembre: 54, 68, 61; Ottobre: 74, 76, 83; Novembre: 80, 77, 66; Dicembre: 57, 86, 75.

Risultati ottenuti col metodo per diluizione di Hiltner e Störmer e col metodo delle piastre (agar-brodo, silico-gel, agar acido sintetico).

Le analisi venivano eseguite ogni tre mesi, e i risultati avuti col metodo di Hiltner e Störmer sono esposti e riassunti nella tabella IV, in cui gli schizomiceti sono espressi con numeri arabi progressivi, i quali accennano al grado di diluizione raggiunto per ciascuna categoria, e, com'è noto, più propriamente: 1 = almeno 100 germi; 2 = 1000; 3 = 10.000; 4 = 100.000; 5 = 1.000.000; 6 = 10.000.000; 7 = 100.000.000; 8 = un miliardo.

La tabella V comprende, invece, i risultati ottenuti col metodo delle piastre.

N. Campioni	Stazione rispetto alla vegetazione	Gruppi di microrganismi specifici	Epoca dei prelevamenti e risultati				Osservazioni
			Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre	
I	Vicino ad <i>Alnus cordata</i>	Azotobatteri	0	1	0	1	Fra i degradatori della cellulosa aerobici comprendiamo, non solo i microrganismi dei generi <i>Cytophaga</i> , <i>Cellvibrio</i> e <i>Cellfalcicula</i> di Winogradsky, ma anche gli eumiceti dotati di evidente potere cellulolitico. E' noto come Halina Felsz Karnicka (77) abbia isolato, per es., ben 13 specie di funghi decomponenti la cellulosa da terreni della Stazione Agraria di Gobieszyn.
		Amilobatteri	1	0	0	1	
		Nitrificanti	0	1	0	0	
		Denitrificanti	2	1	1	2	
		Ammonizzanti	2	2	2	3	
Degradatori cellulosa	1	1	0	0			
II	Vicino a <i>Spartium junceum</i>	Azotobatteri	0	1	0	0	
		Amilobatteri	0	0	0	0	
		Nitrificanti	1	1	0	0	
		Denitrificanti	2	1	1	1	
		Ammonizzanti	2	2	2	2	
Degradatori cellulosa	0	0	0	0			
III	Vicino a piante di <i>Centranthus ruber</i>	Azotobatteri	0	1	0	0	
		Amilobatteri	0	0	0	0	
		Nitrificanti	0	1	0	0	
		Denitrificanti	1	1	1	1	
		Ammonizzanti	2	2	2	2	
Degradatori cellulosa	0	0	0	0			
IV	Vicino a Graminacee spontanee	Azotobatteri	0	1	0	0	
		Amilobatteri	1	0	0	1	
		Nitrificanti	0	0	0	0	
		Denitrificanti	1	1	1	2	
		Ammonizzanti	3	2	1	3	
Degradatori cellulosa	0	0	0	1			

Risultati ottenuti con altri metodi e colla sperimentazione in situ.

Se il metodo classico delle piastre rappresenta per alcuni Autori il solo sistema per isolare e studiare gran parte delle specie microbiche esistenti in un terreno qualsiasi, per noi è ben poca cosa se non è accompagnato da ricerche collaterali *in situ* e in Laboratorio, seguendo altre modalità sperimentali, onde poter mettere in confronto i vari risultati, tenendo nel massimo conto quelli che si ottengono in pieno campo.

Accanto ai molti preparati per impronta (colorati a caldo con eritrosina all'1% in soluzione fenica al 5%) si è adoperato il metodo dei vetrini portaoggetti sepolti, spalmati o non di sostanze chemiotattiche, nonchè le *piastre molate* di Winogradsky e il nostro dispositivo per ottenere culture elettive di alcuni microrganismi specifici. Mentre i vetrini sepolti, senza alcuna aggiunta sulle superfici di contatto col terreno, hanno rivelato una microflora varia, ma non molto abbondante, quelli spalmati con salda d'amido hanno riconfermato, in alcune zone (specie vicino ad *Alnus cordata*)

TAB. V

N. Campioni	Stazione rispetto alla vegetazione	Microorganismi	Agar-brodo carne				Silico-gel				Agar acido sintetico				Osservazioni	
			Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre	Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre	Febbraio	Maggio	Agosto	Novembre		
I	Vicino ad <i>Alnus cordata</i>	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe (1) Actinomiceti Eumiceti	1.560.000	980.000	575.000	800.000	0	6	0	2	0	0	0		(E) Nel termine <i>citofaghe</i> facciamo rientrare anche i Cellvibrioni e le Cellulolicole.	
			0	0	0	0	0	0	0	0	40.000	20.000	8.000	20.000		
			680.000	530.000	451.000	740.000	0	4	0	4	0	0	0	0		
			0	0	0	100	0	0	0	0	10.000	20.000	10.000	30.000		
II	Vicino a <i>Spartium junceum</i>	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe Actinomiceti Eumiceti	362.000	640.000	274.000	381.000	0	4	0	0	0	0	0			
			0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4		
			480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
III	Vicino a piante di <i>Centrurus ruber</i>	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe Actinomiceti Eumiceti	480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0			
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		
IV	Vicino a Graminacee spontanee	Carica batterica totale { Azotobatteri Nitrosobatteri Citofaghe Actinomiceti Eumiceti	480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0			
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			480.000	1.200.000	650.000	780.000	0	6	0	2	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0		

— benchè in numero scarso — la presenza di forme molto simili agli azotobatteri (*), come appare dalla fig. 4.

Anche il nostro dispositivo (fig. 5) (contenente il seguente substrato: sabbia silicea gr. 250, carbonato di calcio gr. 65, carbonato di magnesio gr. 10, argilla bianca « Erba » gr. 40, fosfato bipotassico gr. 0,150, mannite gr. 10, acqua distillata cc. 125) — interrato in prossimità dei posti dove si erano prelevati i campioni per la esecuzione del metodo di Hiltner e Störmer, nonchè per l'allestimento delle piastre di agar-brodo di carne, di silico-gel e di agar acido sintetico — ha dato, non solo la conferma della presenza degli azotobatteri, in alcune località, ma ci ha permesso di osservare anche lo sviluppo di questi interessanti microrganismi in un impasto artificiale sottoposto a continue variazioni climatiche durante due mesi di permanenza in piena terra dell'apparecchio (aprile e maggio 1941). Le culture fatte in soluzione Beijerinck con l'impasto, dopo il disotterramento del dispositivo, hanno dato luogo a sviluppo abbondante dell'*Azotobacter chroococcum* Beij.,

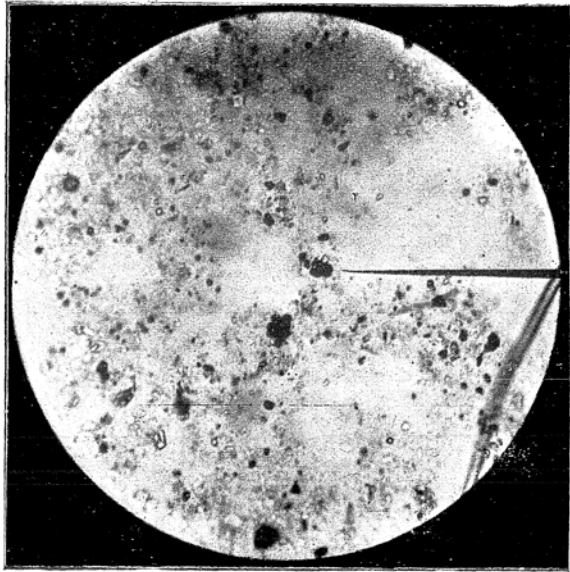


Fig. 4.

mentre i preparati per impronta dello stesso impasto, colorati con eritrosina fenicata, hanno messo in evidenza colonie di azotobatteri, le cui cellule, però, presentavano dimensioni più piccole di quelle che ordinariamente si sviluppano nei substrati di laboratorio (si veda fig. 6). (continua)

*) Non si può asserire, dal semplice esame dei vetrini e dopo le esperienze condotte da Dianowa e Woroschilowa, che si tratti sempre di Azotobatteri; tuttavia, la presenza della sostanza chemiotattica aggiunta sul vetrino, adatta per questo gruppo di microrganismi, e la forma tipica delle cellule, lasciano ritenere che la loro identificazione non debba mettersi in dubbio.