

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

S. Riccardo

(Primo contributo)

(Ricevuto il 12 aprile 1942-XX)

(Continuazione vedi fascicolo precedente)

Lo stesso dispositivo veniva usato anche — come abbiamo accennato innanzi — per i degradatori della cellulosa, aerobici, adoperando il seguente substrato, impastato in mortaio sterile e sotto una cappa batteriologica: sabbia gr. 50; carbonato di calcio gr. 13; carbonato di magnesio gr. 2; argilla bianca « Erba » gr. 8; nitrato di potassio gr. 0,20; soluz. A di Winogradsky (*) (pH = 7,0) gr. 4; acqua distillata gr. 22. La sabbia adoperata era quella marina, prelevata dalla spiaggia di Portici, sottoposta ad un lavaggio prolungato di acqua del Serino fino a completa eliminazione dei cloruri, e prosciugata quindi in stufa. Nell'impasto si ponevano delle listerelle di carta da filtro, la cui maggiore o minore maculazione da parte dei degradatori della cellulosa aerobici, dopo una certa permanenza del dispositivo nel suolo, stava ad indicare il grado di *potere decomponente del terreno sulla cellulosa* (che noi indicammo col nome di *citofagometria*).

Nelle zone dove venne interrato l'apparecchio non si notò alcuna maculazione sulle listerelle di carta, neanche dopo una permanenza sul posto di ben quattro mesi.

Colle piastre amidate di Winogradsky, la presenza degli azotobatteri è risultata positiva in sole due piastre su quindici, allestite con terriccio prelevato da vari punti del Colle Umberto, e in prossimità delle zone precedentemente esaminate. Sono stati notati vicino a Graminacee spontanee e ad *Alnus cordata*, e i loro caratteri morfologici e culturali sono risultati identici a quelli dell'*Azotobacter chroococcum* Beij. — Anche come potere di fissazione dell'azoto, non si discostano dalla specie isolata da noi precedentemente dai terreni vesuviani coltivati.

Ma, se le *piastre molate* di Winogradsky e il nostro dispositivo possono darci delle culture elettive e di arricchimento di determinati microrganismi del terreno, sono lungi dal risolvere la questione di poter isolare molti altri germi che negli ordinari substrati nutritivi di laboratorio — agarizzati o gelatinizzati o imbevuti dal silico-gel — non trovano le condizioni più adatte per il loro sviluppo. Giova, pertanto, fare anche largo impiego di piastre di terra artificiale, insemenate con diluizioni

*) Acqua distillata gr. 100; fosfato monopotassico gr. 0,50; solfato di magnesio gr. 0,25; cloruro di sodio gr. 0,25; solfato di ferro gr. 0,005; solfato di manganese gr. 0,005.

progressive di terreno, già da noi adoperate in altre esperienze con ottimi risultati (34). Anche Madhok (78) ha sperimentato con un substrato sintetico, consistente in una miscela di sabbia e bentonite con aggiunta di *humus* ed altri prodotti (**), ma l'A. non ha pensato a preparare delle piastre per ottenere colonie batteriche; così dicasi di Jensen (79), che ha adoperato un terreno sintetico mescolando 80 % di sabbia, 18,5 % di caolino puro, 1 % di Ca CO_3 e 0,5 % di ossido di ferro.

Le modalità seguite da noi per la preparazione del substrato erano le seguenti: si impastavano in mortaio sterile, colle dovute precauzioni dell'asepsi, i vari componenti, avvertendo che la loro purezza veniva garantita dalla serietà delle Ditte fornitrici (Kahlbaum e Carlo Erba); di sabbia silicea se ne adoperava di due qualità, bianca per alcune piastre, e grigio-scura (come quella marina della spiaggia di Portici, per la presenza di elementi minerali di origine vulcanica) per altre; l'umato di ammonio veniva preparato in Laboratorio secondo il metodo di Krzermie-niewski (80). È ovvio che la sabbia veniva, prima dell'uso, sottoposta a prolungato lavaggio con acqua del Serino, e quindi sterilizzata nella stufa Koch ad aria calda secca. I vari elementi costituenti erano i seguenti: sabbia silicea gr. 250; carbonato di calcio gr. 65; carbonato di magnesio gr. 10; argilla bianca « Erba » sterilizzata gr. 40; umato di ammonio gr. 8; fosfato bipotassico gr. 0,5; solfato ferroso gr. 0,05; solfato di ammonio gr. 0,125; biossido di manganese gr. 0,05; acqua distillata cc. 125.

La terra artificiale, così preparata, veniva messa in scatole Petri sterilizzate in precedenza, e la superficie veniva levigata con un vetro portaoggetti (passato ripetutamente alla fiamma di un becco Bunsen) o col dorso di un cucchiaino sterile in modo da formare un piano il più possibilmente liscio. Tutte le piastre venivano insemminate, senza sottoporle a sterilizzazione (*), colle seguenti diluizioni di terreno: 1:1000; 1:10.000; 1:100.000; 1:1.000.000. Di ogni diluizione si adoperava 1 cmc. e, per poter distribuire uniformemente sulla superficie di ogni piastra la piccola

**) L'*humus* veniva preparato dal terreno, bollendo per un'ora con soluz. al 4% di Na OH, filtrando e precipitando quindi con HCl. L'*humus* così ottenuto veniva lavato con acqua fino ad eliminazione completa dell'acido, e veniva poi messo a contatto con una soluzione contenente gr. 1 di cloruro di ferro, gr. 0,1 di solfato di manganese, gr. 0,1 di solfato di zinco e gr. 0,1 di molibdato di sodio. La proporzione di sabbia e bentonite nel substrato era di 97,5:2,5. Questo substrato, contenuto in bicchieri, veniva addizionato - a seconda dei vari processi microbiologici - di $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, ovvero di cellulosa (carta da filtro), ovvero di cellulosa e $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, ovvero di glucosio + $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ + Ca CO_3 ; l'*optimum* di umidità veniva poi mantenuto in tutti i bicchieri. L'inseminazione si effettuava con 1 cc. di una sospensione acquosa di terreno, e l'incubazione avveniva a 27° C. Le determinazioni numeriche degli ifomiceti e dei batteri decomponenti la cellulosa venivano fatte rispettivamente dopo 10 e 20 giorni. La cellulosa rimasta indecomposta e l'ammontare dell'azoto residuale venivano determinati dopo un mese di incubazione; i nitriti e nitrati venivano determinati settimanalmente. L'ammontare dell'azoto fissato nei bicchieri veniva determinato dopo un'incubazione di cinque settimane.

*) Le ragioni che ci indussero a fare a meno della sterilizzazione appaiono evidenti dalle seguenti conclusioni riportate in un nostro precedente lavoro:

«I risultati avuti, mentre confermano da un lato la bontà della tecnica di studiare «la microflora terricola in substrati che si avvicinino il più possibilmente alle condizioni «del terreno agrario - condizioni non riscontrabili nel silico-gel - , d'altra parte si

quantità di liquido settico si operava nel seguente modo: il cmc. di ciascuna diluizione veniva allungato con 4 cc. di acqua sterile contenuta in provetta, e quindi si distribuivano i 5 cc. di liquido sulla superficie della piastra a mezzo di pipettina sterile. Le piastre, collocate in camere umide entro campane Tyndall, si tenevano a 20° C. per un periodo di tempo non inferiore ai quattro mesi.

I campioni di terra venivano prelevati, oltrechè dalle aree scelte per le precedenti osservazioni, anche da zone dove la vegetazione era rappresentata da muschi o da soli licheni; in quest'ultimo caso, bene inteso, il

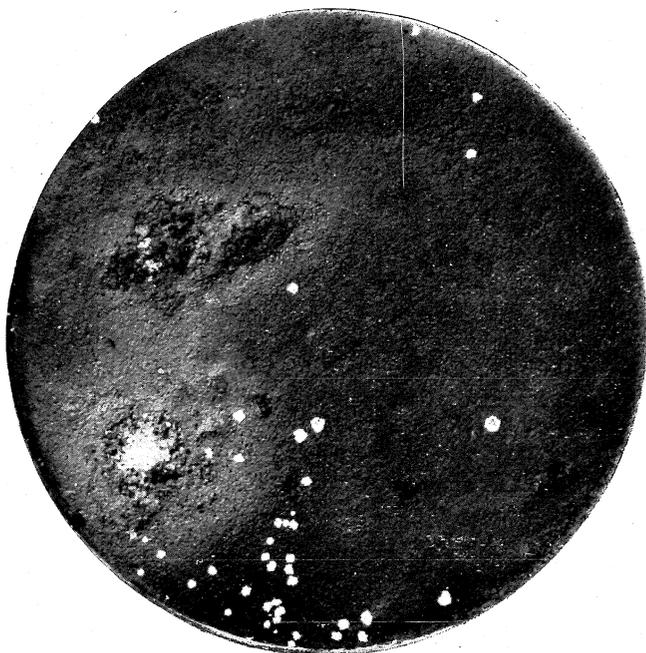


Fig. 7.



Fig. 8.

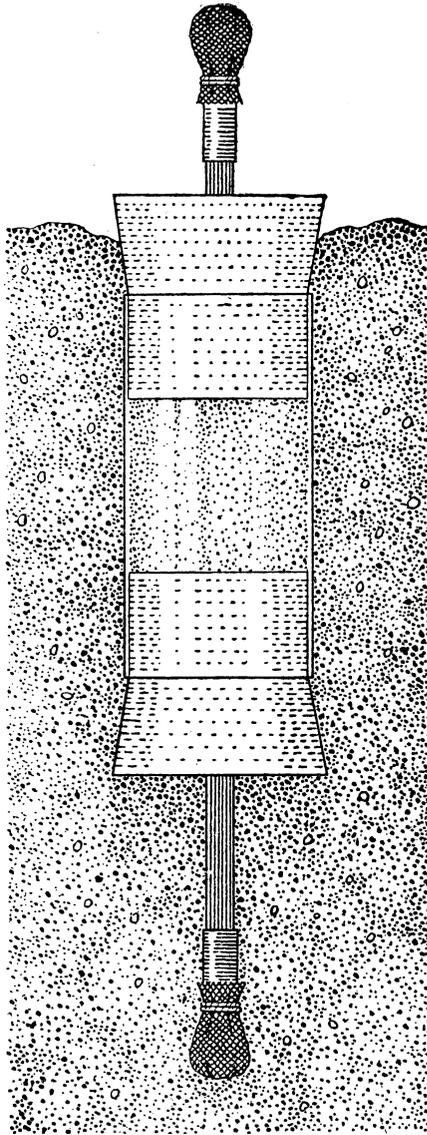


Fig. 5.

« mette in evidenza l'importanza che la sterilizzazione del terreno, basata sull'azione del « calore, può avere nell'impedire o, comunque, limitare lo sviluppo dei microrganismi « in genere per le modificazioni che viene a subire il substrato.

« Si raccomanda, pertanto, di preparare la terra artificiale con prodotti chimici il più « possibilmente puri, di manipolarli in recipienti sterili e in condizioni di asepsi mediante « appositi accorgimenti, e distribuire quindi la massa impastata in piastre sterilizzate « in precedenza ».

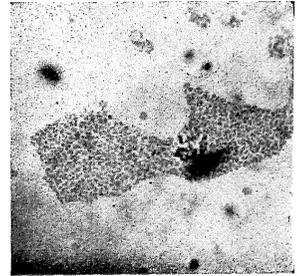


Fig. 6.

campione era costituito in maggior parte da detriti di lava misti a cenere.

I prelevamenti venivano effettuati in febbraio, maggio, agosto, ottobre e novembre, e nella stessa giornata della presa dei campioni si preparavano le diluizioni e si insemenzavano le piastre.

Le colonie sviluppatasi nella maggior parte delle piastre non sono state molto abbondanti, e scarsissime in quelle insemenzate con terra dove prevalevano i detriti di lava e la cenere, anche dopo 6 mesi di permanenza in termostato. Nella fig. 7 si può notare il numero di colonie batteriche sviluppatasi dopo 4 mesi da un campione prelevato vicino a Graminacee spontanee, adoperando la diluizione 1 : 1000; la fig. 8 rappresenta un preparato per impronta di una delle colonie, colorato con eritrosina fenicata. Le colonie, dopo un accurato studio morfo-culturale e delle principali proprietà biochimiche, debbono considerarsi come appartenenti alle seguenti specie: *Bac. nubilus* Frankland, *Bac. sulcatus* Weichselbaum, *Bac. radiobacter* (Beijerinck) Löhns fra gli asporigeni; *Bac. mycoides* Flügge, *Bac. subtilis* (Ehremberg) Cohn, *Bac. vulgatus* (Flügge) Migula, *Bac fusiformis* Gottheil fra gli sporigeni.

Osservazioni e ricerche per mettere in evidenza eventuali forme invisibili di alcuni batteri terricoli.

L'insufficienza della flora microbica, riconoscibile nel suolo, a spiegare alcuni fenomeni biochimici che ivi avvengono (è noto, per es., come il numero degli azotofissatori e dei nitrificanti — che normalmente si riscontrano nel terreno — sia molto esiguo rispetto all'importanza della loro funzione!) ci hanno spinto a ricercare anche l'eventuale presenza di una flora invisibile o ultramicroscopica che dir si voglia.

I risultati negativi avuti finora da alcuni Autori sarebbero dovuti, secondo Novogradsky e Messineva (81) al fatto di non aver preso in considerazione: a) l'adsorbimento (*) di forme invisibili da parte degli elementi colloidali microstrutturali del terreno; b) le influenze stagionali della microflora; c) le specifiche peculiarità morfologiche e fisiologiche di molte forme invisibili, messe in rilievo da vari sperimentatori nel campo della batteriologia medica.

Questi Autori, che hanno sperimentato con due terreni podsolici del Campo sperimentale di Dolgoprudnoie (nei dintorni di Mosca), hanno

*) Non vogliamo attribuire al fenomeno *adsorbimento* (termine di cui si è un po' troppo abusato da parte di alcuni batteriologi agrari (82-83) un significato diverso da quello assegnato dai chimici. Per noi, *adsorbimento vuol dire fissazione da parte di un colloide tanto di sostanze disciolte o disperse quanto di sostanze gassose*. Ora, è noto come il terreno contenga varie sostanze che debbono essere considerate come colloidali, e precisamente: l'argilla, la sabbia finissima, le sostanze umiche, l'idrato di ferro, l'idrato di alluminio, l'acido silicico ed alcuni sali insolubili, come i carbonati, i fosfati, ecc. al momento della loro formazione.

I microrganismi del terreno, anche se questi siano filtrabili, rappresentano, senza dubbio, delle entità che possono cadere nel dominio delle varie forze esercitate dai colloidali, pur non potendo essere *adsorbiti* nel vero significato chimico. Secondo noi, non è il caso di parlare di adsorbimento vero e proprio dei batteri, ma piuttosto di *inglobamento* dei medesimi da parte del terreno.

riscontrato forme invisibili dei seguenti batteri: di un ammonizzante non determinato, di un *Azotobacter* e di un denitrificante. Queste forme invisibili sono capaci di passar attraverso i pori dei filtri batterici. E, più precisamente, l'agente ammonizzante è un micrococco molto vicino, per le sue peculiarità morfologiche e fisiologiche, al *Micrococcus ureae*; attraverso i filtri Berkefeld e Chamberland, ma è quasi incapace di passare attraverso le piastre di amianto del filtro Seitz. In quanto agli Azotobatteri, gli Autori hanno ottenuto delle forme invisibili, la cui capacità a fissare l'azoto era però un po' più debole di quella dell'*Azotobacter* controllo; a differenza del micrococco ammonizzante, questi passerebbero bene anche attraverso i filtri Seitz. Dai campioni di terreno in cui il complesso assorbente veniva in precedenza distrutto (**), l'isolamento delle forme filtrabili degli Azotobatteri riusciva in modo più regolare; queste venivano, inoltre, isolate più facilmente dai terreni trattati con calce che da quelli non trattati.

Barthel e Bengtsson (84) ottennero risultati negativi, inoculando terreni (previamente sterilizzati e addizionati con varie sostanze, come solfato ammonico, urea e cellulosa) con un estratto di terra filtrato attraverso un filtro Pukall: l'estratto di terra non provocò nel terreno sterile nè il processo della nitrificazione, nè quello della fermentazione dell'urea, e tanto meno la decomposizione della cellulosa. Le prove di controllo, invece, fatte inoculando lo stesso terreno sterilizzato col 0,5 % di suolo non sterile, dettero luogo a forte fermentazione di urea e a decomposizione della cellulosa; il processo di nitrificazione risultò poco evidente per il fatto che vengono a formarsi nel terreno, durante la sterilizzazione, delle sostanze organiche solubili, dannose ai batteri specifici di siffatto processo. In base a questi risultati, gli AA. così concludevano: «*Organismi ultravisibili non si trovano viventi liberamente (saprofiticamente), ma solo in diretta unione colle cellule viventi (parassiticamente).*»

Allo stesso risultato negativo pervenne Rossi (85), sperimentando con terreno coltivato dalla zona bassa vesuviana.

Nelle ricerche da noi eseguite si è tenuto conto tanto della metodica adoperata dal Rossi nel 1920-21 quanto di quella più recente di Novogradsky e Messineva.

Più precisamente, il metodo consisteva nel mescolare la terra di fresco estratta con acqua distillata a pesi uguali, nel lasciare decantare per 30 minuti e nel filtrare il liquido decantato attraverso le candele Chamberland F e B e le candele Berkefeld N e W. Il liquido, contenente gli eventuali invisibili, scendeva asetticamente in Erlenmeyer contenenti soluzioni nutritive sterili, in cui i detti microrganismi avrebbero potuto dare eventuali reazioni.

Se ne filtravano circa 50 cmc., che andavano a mescolarsi con 200 cc. di liquido di prova, e i 50 cc. erano misurati da un segno fatto con diamante, e in precedenza, sulle Erlenmeyer.

**) Ogni campione veniva sottoposto ad un doppio trattamento: a) il terreno veniva semplicemente mescolato con acqua sterile e agitato; b) il terreno veniva prima lavato con soluz. N di NaCl e quindi con soluz. 0,0001 N di Na OH. Gli estratti così ottenuti venivano filtrati attraverso filtri *Berkefeld N, Chamberland L3 e Seitz.*

Era nostra intenzione ricercare le principali reazioni che si attribuiscono ai germi visibili, cioè: reazioni putrefattive (ricerca dell'ammoniaca e dell'indolo); reazioni nitrosanti e nitrificanti; fissazione dell'azoto. Naturalmente occorreva sincerarsi in precedenza che il liquido filtrato non contenesse già per conto proprio i principii cui avrebbe dovuto dare luogo.

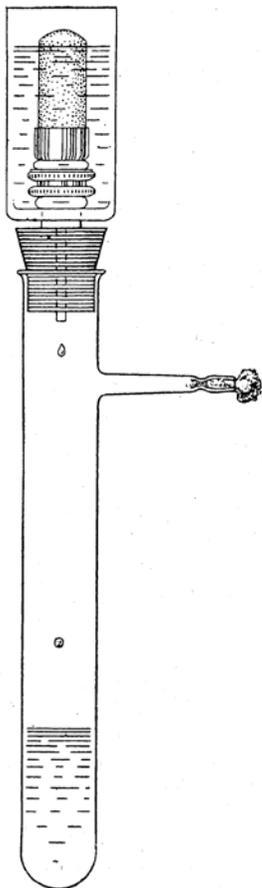


Fig. 9.

Oltre all'uso delle Erlenmeyer, abbiamo adottato la filtrazione diretta (per aspirazione) degli estratti di terra in speciali tubi, come sono rappresentati dalla fig. 9, allo scopo di eliminare il più possibilmente gli inquinamenti accidentali dei liquidi di saggio. Le soluzioni nutritive erano identiche a quelle adoperate per il metodo di Hiltner e Störmer colla variante che, per gli Azotobatteri, venivano usati, oltre alla soluzione alla mannite di Beijerinck, altri substrati (contenenti 0,01% di KNO_3) che a Novogradsky e a Messineva avevano facilitato la comparsa delle forme invisibili.

Abbiamo creduto di insistere sulla ricerca degli eventuali invisibili dell'*Azotobacter*, prestandosi questo microrganismo più degli altri — per le sue peculiarità morfo-fisiologiche (*) — a ricerche del genere.

I risultati da noi ottenuti finora si possono così riassumere:

1) La sospensione di terra dei vari campioni, filtrata sia con candele Chamberland che con quelle Berkefeld, non ha dato la reazione dell'indolo. Neanche il filtrato aggiunto in brodo-peptone ha dato la reazione dell'indolo, anche dopo un mese di permanenza in termostato delle Erlenmeyer e dei tubi.

2) Mentre la maggior parte dei filtrati hanno dato la reazione dell'ammoniaca e dei nitriti — sia nei controlli che nei liquidi inficiati — non è stato possibile isolare delle forme invisibili capaci di trasformarsi nelle forme visibili dei microrganismi specifici. La soluzione circolante non provocò nessun aumento di nitriti, oltre quelli che conteneva naturalmente il liquido di Omelianski, modificato da Löhnis e Green: acqua distillata cc. 100; solfato ammonico gr. 0,10; fosfato bipotassico gr. 0,10; solfato magnesico gr. 0,05; cloruro sodico gr. 0,20; solfato ferroso gr. 0,04; carbonato di calcio in eccesso.

3) In quanto alla fissazione dell'azoto, non si è notato un sensibile aumento rispetto ai controlli contenenti il solo filtrato, anche dopo due mesi di termostato. Facendo dei trapianti su agar-Beijerinck, sia in tubi che in piastre, non si è avuto sviluppo di azotobatteri (tanto in forma di gonidi che di cellule adulte, ad otto, o di forme degenerate). Anche l'aggiunta del 0,01 % di KNO_3 , sia nei substrati liquidi che solidi, non ha facilitato la comparsa di forme invisibili (capaci di dar luogo alle forme visibili) degli azotobatteri.

Riusciti vani i tentativi coi vari campioni prelevati nella zona bassa del Colle Umberto, abbiamo voluto provare col terreno del giardino dell'Osservatorio Vesuviano, che, facendo parte del Colle Canteroni, deve considerarsi — come abbiamo detto innanzi — *terra vecchia* dell'antica muraglia circolare del Somma. Solo dopo molti tentativi siamo riusciti ad ottenere poche piccole colonie mucose, in una piastra di agar-Beijerinck e in due di terra artificiale (*), fra quelle insemenate con filtrato di terreno, e precisamente lo sviluppo si è avuto con filtrato per candela Berkefeld N.

Avendo eseguito la filtrazione con candele già collaudate, e nelle migliori condizioni di asepsi, riteniamo di aver eliminato al massimo i possibili inquinamenti o gli accidentali passaggi attraverso il filtro di piccoli gonidi di azotobatteri. Quest'ultimo fatto non esclude, tuttavia, che proprio a lato dei noti gonidi — che vengono messi in libertà dalle cellule invecchiate e rotondegianti dell'*Azotobacter* — possano formarsi

*) E' nota la formazione di piccoli corpicciattoli sferici (gonidi), già da noi osservati in culture monocitogenetiche nel 1924, ed osservati inoltre da Löhnis e Smith (7-8), da Petschenko (86), e da altri Autori. Non era da escludere, quindi, che forme ancora molto più piccole dei gonidi potessero mettersi in libertà in seguito alla rottura delle grosse cellule rotondegianti ed invecchiate degli Azotobatteri, capaci di attraversare i filtri Chamberland e Berkefeld.

*) Sabbia bianca sterile gr. 250; carbonato di calcio 65; carbonato di magnesio 10; argilla bianca «Erba» sterilizzata 40; fosfato bipotassico 0,150; mannite 8; acqua dist. 125.

altri corpuscoli infinitamente più piccoli, invisibili al microscopio, capaci di attraversare le pareti del filtro.

I caratteri morfologici delle cellule originatesi da forme invisibili sia su piastre di agar-Beijerinck che di terra artificiale non si differenziano da quella degli azotobatteri che si isolano ordinariamente dal terreno; di dimensioni più piccole che negli ordinari substrati di Laboratorio, non appena trapiantate su agar-Beijerinck o su agar-Ashby o nei corrispondenti substrati liquidi, le piccole cellule azotofissatrici riacquistano poco alla volta le normali dimensioni nonchè le note peculiarità morfologiche del tipico *Azotobacter*.

Alla prova col Kjeldahl, la specie isolata dal filtrato di terra, si è rivelata fissatrice di azoto, per quanto un po' meno attiva rispetto ad un ceppo isolato direttamente dal terreno su agar all'estratto di terra alla mannite.

I risultati da noi ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

Numero progressivo cultura	Substrato nutritivo	Concentraz. idrogenion. pH	Filtro adoperato	Mg. N fissato in 100 cc. dopo un mese a 28° C.	Osservazioni
I	Soluz. alla mannite di Beijerinck	7,2	Berkefeld « N »	6,6	Controlli (<i>Azotobacter chroococcum</i> Beij, isolato su agar all'estratto di terra alla mannite).
II	id. id.	„	id. id.	7,2	
III	id. id.	„		9,2	
IV	id. id.	„		8,4	

CONCLUSIONI

Dalle ricerche eseguite finora si può rilevare quanto segue:

1) La piccola quantità di terriccio misto a cenere, che man mano si è andato formando nelle anfrattuosità delle lave del 1895-99, in alcune zone basse del Colle Umberto, possiede una carica batterica che, da poche migliaia di germi per grammo, può oltrepassare il milione là dove la flora risulta maggiormente progredita.

È ovvio che queste cifre potranno subire sensibili oscillazioni, soprattutto a causa delle cosiddette « acque caustiche » la cui azione deleteria è dovuta per la massima parte ad acido cloridrico (87). È risaputo, tuttavia, come la resistenza di molti microrganismi presenti in alcuni fanghi vulcanici sia notevole, per cui quasi indisturbata può svolgersi la loro azione in alcuni processi biochimici, come ha messo in rilievo qualche Autore (88).

2) I principali gruppi di microrganismi interessanti la fertilità di un terreno agrario vi sono rappresentati: gli ammonizzanti, gli azotofissatori e i nitrificanti. Questi ultimi ancora molto scarsi, e assenti addirittura in alcune zone, come pure scarseggiano o possono risultare assenti gli azotofissatori, sia aerobici che anaerobici; la presenza degli azotofissatori anae-

robici si è notata soltanto in due delle zone esaminate e nei mesi di febbraio e novembre, nei quali si sono avuti rispettivamente mm. 178,8 e 144,5 di pioggia.

3) Una grande importanza, ai fini dell'insediamento della microflora sulle lave del Colle Umberto, ha indubbiamente la vicinanza del Colle Canteroni - sede dell'Osservatorio col giardino annesso - dove incominciano ad osservarsi le graminacee perenni con la *Sesleria nitida* Ten., dove ha anche inizio la regione che potremmo chiamare delle selve, in cui figurano il *Cytisus Laburnum* L., l'*Acer obtusatum* W. e K., il *Populus australis* T., l'*Alnus cordata* Desf., la *Castanea sativa* Mill., l'*Ostrya vulgaris* W., la *Quercus Robur* L.), nonché la regione dei ginestreti, comprendente lo *Spartium scoparium* L., lo *Spartium Junceum* L., la *Genista tinctoria* L., il *Cytisus triflorus* l'Hérit, la *Colutea arborescens* L.

Di somma importanza, infine, è il continuo apporto di germi nella opera di rimboschimento, che la Milizia Forestale sta operando da vari anni, con piantagioni di *Pinus Pinea* L., *Pinus austriaca* Link, *Spartium junceum* L., *Spartium scoparium* L., *Genista aetnensis* D. C.

I pini, di pochi mesi di età, vengono collocati a dimora con una zolletta di terra attorno alle radici, in fossette di m. 0,40 x 0,40 x 0,40.

4) Per quanto riguarda le forme invisibili (?) degli azotobatteri, riteniamo che debbano rapportarsi a piccolissimi gonidi (conidi di Almquist) capaci di attraversare i filtri batterici, i quali gonidi danno poi origine al tipo batterico dell'*Azotobacter*, come abbiamo già messo in rilievo nel 1924. Non rappresentano, quindi, nessuna novità le osservazioni di Novogradsky e Messineva, relative alle forme invisibili degli azotobatteri. Il ciclo di sviluppo di questi microrganismi è stato studiato con metodo rigoroso, e pertanto nessuna *ciclogenesi* (*) complicata è ammissibile come quella voluta da alcuni Autori.

RIASSUNTO

Dopo una breve rassegna sui lavori precedentemente compiuti e sulla metodica seguita per lo studio dei principali gruppi di microrganismi anabolici e catabolici, si espongono i risultati ottenuti con vari campioni prelevati nella zona bassa del Colle Umberto (lave del 1895-99). Si dà conto, altresì, delle osservazioni compiute sulla presenza di eventuali germi invisibili negli stessi campioni, e, per gli azotobatteri, anche nel terreno del giardino dell'Osservatorio Vesuviano (*terra vecchia* dell'antica muraglia circolare del Somma).

*) E' noto come questo termine sia stato adoperato da Enderlein (89). Questi si è occupato della citologia comparata dei microbi, delle diverse forme di riproduzione, e della teoria della « ciclogenesi batterica ». Secondo l'A. - che ha creato oltre 150 termini per indicare parti morfologiche e fenomeni interpretati secondo la sua teoria! - ogni specie batterica dovrebbe obbligatoriamente passare per i diversi stadi morfologici filogeneticamente più antichi. La ciclogenesi sarebbe la risultante di due coordinate: lo sviluppo numerico (*auxanogenesi*) e la differenziazione (*probenogenesi*). In alcune specie quest'ultima prevarrebbe e si potrebbero allora avere nelle colture tutte le forme del ciclo, in un quadro di grande polimorfismo!

ZUSAMMENFASSUNG

Verf. berichtet kurz über die früheren Untersuchungen und über die Methodik, welche beim Studium der hauptsächlichsten Gruppen anaboli-scher und katabolischer Mikroorganismen eingehalten worden ist. Es wer-den auch die Ergebnisse mitgeteilt, welche mit verschiedenen, aus der tiefliegenden Gegend von «Colle Umberto» (Lava aus 1895-1899) starn-menden Musterproben, erhalten worden sind.

Zum Schluss berichtet Verf. über die bezüglich des Vorhandenseins etwaig unsichtbarer Keime in denselben Musterproben gemachten Beobachtungen und, ferner, betreffs der Stickstoffbakterien, auch in der Gar-tenerde des Observatoriums vom Vesuv (*alter Boden* der antiken Mauer des Somma).

BIBLIOGRAFIA

(1) *C. Rossi e S. Riccardo* - Saggi di batteriologia vesuviana. « Nuovi Annali del Ministero pr l'Agricoltura » Roma, A. I, n. 2, 31-XII 1921, pp. 241-255.

(2) *S. Riccardo* - Le streptotricce dei terreni vesuviani. « Annali della R. Scuola Sup. di Agricoltura in Portici » volume XVIII, 1923 (pag. 14).

(3) *S. Riccardo* - Primo contributo alla conoscenza dei batteri fissatori di azoto nei terreni vesuviani. Idem, volume XVIII, 1923 (pag. 50).

(4) *S. Riccardo* - Secondo contributo alla conoscenza degli azotofis-satori dei terreni vesuviani. « Annali del R. Istituto Sup. Agrario » Portici, 1925 (pag. 39).

(5) *C. Rossi e S. Riccardo* - I terreni della regione del Vesuvio e la fissazione dell'azoto. *Act. Intern. de Pedologie*, Soc. Int. della Scienza del Suolo, Roma, 1924 (pag. 78).

(6) *G. Rossi* - Il Vesuvio e la biologia. « L'Italia Agricola » n. 11, novembre 1928; n. 3 e 8, marzo-agosto 1929.

(7) *F. Löhnis and N. A. Smith* - Life cycles of the bacteria (Prelimi-nary communication). *Journal of Agricultural Research*. Washington, vo-lume VI, n. 18, 31 luglio 1916, pp. 675-702.

(8) *F. Löhnis and N. A. Smith* - Studies upon the life cycles of the bacteria. Prt. II: life history of *Azotobacter*. *Journal of Agricultural Re-search*. Washington. Vol. XXIII, n. 6, 10 febbraio 1923, pp 401-432

(9 - 22) *S. Winogradsky* - Études sur la microbiologie du sol. (Da: 1^a Mémoire. Sur la méthode del 1925, fino alla recente del 1941: Sur la synthèse enzymatique de l'ammoniac dans le sol et les eaux, in « *Annales de l'Institut Pasteur* » Paris, voll. 39, 40, 42, 43, 48, 50, 56, 60, 61 e 66; e ancora in « *Chimie et Industrie* » 1924; in « *Soil Science* » vol. 40, 1935; in « *Comptes Rendus de l'Ac. des Sciences* » vol. 203, 1936.

(23) *H. J. Conn* - An Improved Stain for Bacteria in Soil. *Stain Technology*, vol. I, 1926, pp. 125-128.

(24) *H. J. Conn* - The microscopic study of bacteria and fungi in soil. « *Tecnical Bulletin* » n. 64 (New York Agr. Exp. Station), 1927.

- (25) *H. J. Conn* - A Type of Bacteria Abundant in Productive Soils, but Apparently Lacking in Certain Soils of Low Productivity (N. Y. Agric. Exp. Station, Techn. Bull. 138) 1928.
- (26) *H. J. Conn* - Use of the microscope in studying the activities of bacteria in soil « Journal of Bacteriology » New York, vol. XVII, n. 6, June 1929, pp. 399-405.
- (27) *H. J. Conn* - The Cholodny Technic for the Microscopic Study of the Soil Microflora. « Centralbl. f. Bakt. » II Abt. Bd 87, n. 9-12, 1932, pp. 233-239.
- (28) *H. J. Conn* - A Bacteriological Study of a Soil type by new methods. « Soil Science » vol. XXV, n. 4, april 1928.
- (29) *H. J. Conn* - On the microscopic method of Studying Bacteria in Soil. « Soil Science » vol. XXVI, n. 4, october 1928.
- (30) *G. Rossi e S. Riccardo* - L'esame microscopico e batteriologico diretto del terreno agrario. « Nuovi Annali dell'Agricoltura ». Provveditoriato Gen. dello Stato, Libreria, Roma, A. VII, 1927, pp. 457-470 con 2 Tav. in tricromia.
- (31) *G. Rossi e S. Riccardo* - The direct microscopical and bacteriological examination of agricultural soil. « Proceedings and papers of the First International Congress of Soil Science convened in Washington » (giugno 1927); Washington, 1928, vol. III, p. 9.
- (32) *G. Rossi, S. Riccardo, G. Gesuè, M. Stanganelli and Tsu-Kao Wang* - Direct microscopic and bacteriological examination of the soil. « Soil Science » Baltimora, n. 1, 1936.
- (33) *S. Riccardo* - Dispositivi per ottenere in pieno campo culture elettive della microflora terricola. « Annali del R. Istituto Sup. Agrario di Portici » Serie III, vol. II, 1927, pagine 305-312, ed una Tav. in tricromia.
- (34) *S. Riccardo* - Sui substrati per lo studio della microflora terricola in relazione alla cosiddetta « Microbiologia ecologica » del Winogradsky (Contributo sperimentale, con una tavola). « Annali della Facoltà di Agraria della R. Università di Napoli » Serie III, vol. X, 1939, pp. 175-185.
- (35 - 37) *M. Koffman* - Eine Methode zur direkten Untersuchung der Mikrofauna und Mikroflora des Bodens. Centralbl. für Bakt., II Abt., Bd 75, 1928, pp. 28-45; Bd 78, 1929, pp. 337-351; Bd 85, 1931, pp. 1-11.
- (38) *N. Cholodny* - Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. « Archiv für Mikrobiologie » I Band, 4 Heft, Berlin, Springer, 1930.
- (39) *Jadwiga Ziemiecka* - Rozkład pentozanów przez mikroorganizmy gleby. « Roczniki Nauk Rolniczych i Lesnych » T. XXV, Poznan 1931.
- (40) *J. Ziemiecka* - Nowe sposoby badania mikroorganizmów rozkładających w glebie substancje organiczne. « Roczniki Nauk Rolniczych i Lesnych » T. LXXXIII, Poznan 1934.
- (41) *J. Ziemiecka* - The use of a modified Rossi-Cholodny technic for studying the organisms that decompose certain organic compounds in soil. « Centralbl. f. Bakt. » II Abt. Bd 91, 28 febbraio 1935, n. 16-21.

(42) *E. W. Dianowa und A. A. Woroschilowa* - Azotobacter-ähnliche Bakterien im Boden. «Centralbl. f. Bakt.» II Ab. 1931, Bd 84, n. 19-22, pp. 433-452.

(43) *K. J. Demeter und Hans Mossel* - Ueber die Brauchbarkeit von Cholodny mikroskopischen «Aufwuchsplattenmethode» bei mikrobiologischen Boden Untersuchungen. «Centralbl. f. Bakteriologie» Bd 88, 31 luglio 1933, n. 17-22.

(44) *K. J. Demeter* - Neue Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung von Boden. «Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden» von E. Abderhalden, München, Abt. XII, Teil 2, pp. 771-887, 1935.

(45) *W. Kubierna* - Ein Bodennicroskop für Freiland-und Laboratorium-gebrauch. «Bodenkundliche Forschungen» Wien, Bd III, 1932, n. 2, pp. 91-102.

(46) *W. Kubierna* - Mikropedologysche Untersuchungen über Kristallneubildungen in Bodenholträumen. «Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde» Teil A, 31 Band, Heft 4-6, 1933.

(47) *W. Kubierna* - Ueber das Elementargefüge des Bodens. «Bodenkundliche Forschungen» Wien, Bd IV, 1935, n. 4, pp. 380-412.

(48) *W. Kubierna and C. E. Renn* - Micropedological Studies of the Influence of Different Organic Compounds upon the Microflora of the Soil. «Centralbl. f. Bakt.» II Abt. Bd 91, 1935, n. 11-15.

(49) *H. L. Jensen* - The Rossi-Cholodny method as a quantitative index of the growth of fungi in the soil, with some preliminary observation on the influence of organic matter on the Soil microflora (III Contributions to the microbiology of australian soils). «Proceedings of the Linnean Society of New South wales» p. 3-4, 1935.

(50) *G. Rossi e G. Gesuè* - Di un nuovo indirizzo nello studio biologico del suolo. «Annali di Tecnica Agraria» Portici, vol. III, 1930, pp. 196-248.

(51) *G. Rossi und Wang Tsu-Kao* - Neue Studien für eine Bakterien-theorie des landwirtschaftlichen Bodens. «Bodenkundliche Forschungen» Bd IV, n. 3, 1935.

(52) *Wang Tsu-Kao and Chih-San Chia* - The direct microscopic examination of Microorganisms in Agricultural Soil of Northern China. «The Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, National University of Peiping». Peiping, China, maggio 1936.

(53) *B. Stille* - Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre. «Arch. f. Mikr.» vol. 9, n. 5, 1938, pp. 477-485.

(54) *R. L. Starkey* - Some influence of the development of higher plants upon the microorganisms in the Soil. VI. Microscopic examination of the Rhizosphere. «Soil Science» vol. 45, n. 3, 1938, pp. 207-249.

(55) *M. Winnik and M. Goldberg* - Studies on Azotobacter and nitrifyingorganisms in relation to various fertilizer treatments in Soils under citrus culture conditions. «Trans. Comm. Int. Soc. of Soil Science» volume A, 1939, pp. 175-138.

(56) *S. A. Waksman, T. C. Cordon and N. Hulpoi* - Influence of

temperature upon the microbiological population and decomposition processes in composts of stable manure. «Soil Science» vol. 47, 1939, pp. 83-115.

(57) *O. Comes* - Le lave, il terreno vesuviano e la vegetazione. «Stab. Tip. Vesuviano» Portici, 1888.

(58) *Licopoli* - Storia naturale delle piante crittogamiche che nascono sulle lave vesuviane. Napoli, 1871.

(59) *Hiltner e Stormer* - Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. Arbeiten aus der Biologischen Abtheilung für Land- und Forstwirtschaft, Bd III, 5 Heft, 1903, p. 474 e s.

(60) *G. De' Rossi* - I microbi del terreno e la fissazione dell'azoto atmosferico. «Atti del IV Congresso di Microbiologia» Milano, 3-5 ottobre 1932.

(61-62) *G. De' Rossi* - La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. *Bollettino della Sez. italiana della Soc. Int. di Microbiologia*, Milano, fasc. II e VI, 1933 e 1935.

(63) *G. Rossi e S. Riccardo* - L'azione dei vari tipi di lavorazione del suolo agrario sui microrganismi terricoli. (Contributo allo studio dell'aridocoltura italiana). «Annali della Facoltà di Agraria della R. Università di Napoli, Serie III, vol. IX, 1938.

(64) *Lohnis* - Ein Beitrag zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung. *Centralbl. f. Bakt.*, II Abt., Bd XII, p. 459.

(65) *Millard* - Bacteriological Tests in Soil and Dung. - *C. f. B.*, II Abt., Bd 31, numero 16-22, 10 nov. 1911, pp. 502-507.

(66) *Wilson* - The number of ammonia-oxidizing organisms in soils. Reprinted from «Proceedings and Papers of the First International Congress of Soil Science»; vol. III. June 13-22, 1927.

(67) *Lewis* - The distribution of green fluorescent bacteria in soils as determined by the Hiltner-Störmer dilution method. «*Centralbl. f. Bakt.*» II Abt., Bd 81, 1930, pp. 368-371.

(68) *Cutler* - A Method for estimating the number of active protozoa in the soil. «*The Journal of Agricultural Science*», vol. X, part II, April 1920.

(69) *Barthel* - Bodenbakteriologische Untersuchungen. «*Centralbl. f. Bakt.*» II Abt., Bd 25, n. 1-4, 1909, pp. 108-125.

(70) *S. Riccardo* - Sugli agenti della nitrificazione e sulle difficoltà che s'incontrano nel loro studio. (Note di critica sperimentale). «*Zymologica e Chimica dei colloidi*». A. I e II, n. 5-6, Bologna, nov. e genn. 1927.

(71) *S. Riccardo* - Sulla degradazione microbiologica della cellulosa (Esperienze in pieno campo e in Laboratorio). «*Annali del R. Istituto Sup. Agrario di Portici*» Serie III, v. V, 1931, pp. 153-173.

(72) *S. A. Waksman and E. B. Fred* - A tentative outline of the Plate method for determining the number of Microorganisms in the Soil. «*Soil Science*», 1922, XIV, pp. 27-28.

(73) *O. Bottini* - La Regione Vesuviana. Studio chimico-geografico

(con 1 tavola) - La Zona Alta - « Annali di Tecnica Agraria » A. V-VI, Portici, 1932.

(74) *G. Mercalli* - Vulcani e fenomeni vulcanici in Italia. (Parte III della « Geologia d'Italia » di G. Negri, A. Stoppani e G. Mercalli). Milano, F. Vallardi, 1883.

(75) *G. Mercalli* - I vulcani attivi della terra. Milano, Hoepli, 1907.

(76) *A. Malladra* - La pioggia sul Vesuvio. « Bollettino della Società Sismologica Italiana » Vol. XVIII, fase. 1-2, 1914.

(77) *H. F. Karnicka* - Pozkład cellulozy w glebach Kwasnyck. *Memorie dell'Istituto Nazionale Polacco di Economia Rurale a Pulawy*, XVI, fasc. I, 1935, memoria n. 240, Pulawy, 1936.

(78) *M. R. Madhok* - Synthetic soil as a Medium for the Study of certain microbiological processes. « Soil Science » Baltimore, U.S.A., Vol. 44, n. 4, October 1937, pp. 319-322.

(79) *H. L. Jensen* - Contribution to the Microbiology of Australian Soils. *Lim. Soc. N. S. Wales, Proc.* 60, 1935, p. 3-4.

(80) *G. De' Rossi* - Microbiologia Agraria e tecnica, U.T.E.T., Torino, 1927, pp. 848.

(81) *D. Novogrudsky and M. Messineva* - The invisible forms of Soil Bacteria. « Microbiology » Vol. III, Part 4, Leningrad, 1934, pp. 470-485 (dal russo).

(82) *N. N. Chudiakow* - Ueber die Adsorption der Bakterien durch den Boden und den Einfluss derselber auf die mikrobiologischen Bodenprozesse. « Centralbl. für Bakt. » II Abt., Bd 68, n. 15-25, 1926, pp. 345-358.

(83) *A. R. Minenkow* - Adsorption von Bakterien durch verschiedene Bodentypen. « Centralbl. für Bakt. » II Abt., Bd 78, n. 1/7, 1929, pp. 109-112.

(84) *Ch. Barthel och N. Bengtsson* - Aro ultravisibla organismer verksamma i Akerjorden? « Meddelande N. 341 fran Centralanstalten för försöksväseudet på jordbruksomradet. « Bakteriologiska avdelningen ». N. 47, Stockholm, 1928.

(85) *G. Rossi* - Preliminary Note on the microbiology of the Soil and the possible existence therein of invisible. « Soil Science » Vol. XII, 1921, p. 409.

(86) *B. v. Petschenko* - Ueber die Biologie, die Morphologie und den Eutwicklungszyklus von Mikroorganismen der Azotobactergruppe. « Centralbl. für Bakt. » II Abt., Bd 80, p. 161-162, 1930.

(87) *O. Bottini* - Le piogge caustiche nella regione vesuviana. « Annali di Chimica Applicata » Roma, Vol. 29, fasc. 10, 1939, pp. 425-433.

(88) *L. Rubentschik* - A contribution to the Microbiology of Mud of Mud-Volcanoes. « Microbiology » Vol. V, part 4, Leningrad, 1936, pp. 451-464 (dal russo).

(89) *G. Enderlein* - Bakterien-Zyklogenie. De Gruyter, Berlin, 1925.