

l'azione dei Protozoi è, secondo lui, minima, ma può diventare ragguardevole in abnormi condizioni. Nel terreno sabbioso, con un tenore minimo d'umidità e un numero piccolo di Protozoi, questi possono stimolare l'attività dei batteri fissatori di azoto e favorire così la crescita delle piante. Nei terreni di marcia e di serra i Protozoi si moltiplicano energicamente, mangiano numerosi batteri, limitandone perciò l'attività, e conducono all'arresto della crescita delle piante. Secondo l'Autore giapponese, l'azione favorevole dei Protozoi sulla crescita delle piante, può anche essere determinata dal fatto che nel terreno umido essi possono mangiare Batteri patogeni per le piante.

Questo Autore quindi considera i Protozoi talvolta come fattori favorevoli, talvolta come sfavorevoli alla vita delle piante, ma sempre ne riconosce una certa importanza.

Il problema della funzione dei Protozoi del terreno è considerata da un punto di vista sintetico-naturalistico dal FRANCÉ, e il suo punto di vista è accettato dal REICHENOW. Secondo questi Autori, « anziché considerare soltanto i rapporti fra Protozoi e Batteri, è molto più giusto considerare i Protozoi nel quadro generale dell'*edaphon*, nel quale i Batteri e i Funghi « del terreno lavorano come produttori di sostanze azotate per « le alghe edafiche, le quali, assieme a Batteri e Funghi, servono « alla loro volta di nutrimento ai Protozoi, in parte anche ai Rotiferi e ai Nematodi. Questi alla loro volta vengono mangiati « da Amebe, Miriapodi, Tardigradi. Tutto il piccolo mondo edafico sarebbe poi inghiottito dai Lombrichi ». Secondo FRANCÉ, i piccoli esseri dell'*edaphon* contribuirebbero all'aerazione del terreno e al suo spezzettamento, impedendo la perdita di alcune sostanze dell'*humus*. Infine il FRANCÉ afferma che i terreni migliori sono abitati anche da un ricco *edaphon* che rappresenta un indice della fertilità del terreno. Parlando in generale di *edaphon* il FRANCÉ vi comprende giustamente i Protozoi.

REICHENOW, mettendo sulla bilancia i danni e i vantaggi che possono portare i Protozoi nella vita del terreno, ritiene che gli uni compensino gli altri. Per il fatto che i Protozoi, per le labili condizioni di vita che trovano nel terreno, muoiono continuamente in grande quantità, essi contribuiscono a concimare il terreno, compensando in questo modo il danno che essi arrecano mangiando una parte dei Batteri.

FELLERS e ALLISON ammettono in linea generale che un terreno fertile è più ricco di Protozoi di quello non fertile, e che dove vi son molti Batteri vi sono anche molti Protozoi. Ciò è stato confermato dal SANDON che però cita delle eccezioni: il terreno fertile di Antigua che conteneva pochi Protozoi, mentre un terreno povero ad Erica nella Groenlandia ne conteneva in maggior numero in confronto di un terreno coperto da vegetazione lussureggiante.

NOWIKOFF ammette in via generale che i Protozoi abbiano una certa importanza nella circolazione della vita nel terreno, e corrispondentemente anche nei processi dai quali dipende la fertilità del terreno stesso.

Il RUSSEL introduce un altro concetto che turba un po' l'armonico quadro del FRANCÉ su un edafon lavorante per la fertilità del terreno. Secondo il RUSSEL, la popolazione microbica del suolo è occupata più che altro a mantenere sé stessa, e soltanto incidentalmente a beneficiare le piante, anzi talvolta le danneggia.

Il VARGA, studiando i Protozoi dei terreni delle foreste dell'Europa centrale, arriva alla conclusione che i Protozoi che in essi vivono, contrariamente al concetto dei ricercatori americani, pur non avendo una funzione importante come i Batteri, ne hanno una non trascurabile per la vita generale del terreno. Essi infatti faciliterebbero la trasformazione delle sostanze organiche, e la decomposizione dei corpi morti dei Protozoi contribuirebbe in modo non trascurabile all'arricchimento del contenuto in azoto del terreno di foresta. Secondo VARGA, il terreno delle foreste possiede una peculiare fauna protozoaria.

CAPITOLO II.

Sull'esistenza di Protozoi attivi nel terreno e metodi di studio

Molto controverso è stato il problema dell'esistenza di Protozoi allo stato attivo nel terreno. Parecchi studiosi americani hanno affermato che i Protozoi si trovano nel terreno soltanto allo stato di cisti.

Secondo KOCH, che usò metodi di osservazione diretta

(osservazione al microscopio di un volume determinato di sospensione di terra) il terreno normale di campo non alberga Protozoi allo stato attivo; solo il terreno di serra, contenente molta sostanza organica e molta acqua, contiene pochi Protozoi allo stato attivo. Anche NOWIKOFF ha usato metodi di osservazione diretta, e conclude che esistono Ciliati e Amebe attive in quasi tutti i campioni di terreno molto umidi da lui esaminati, benchè in numero non rilevante.

Però MARTIN e LEWIN dimostrarono per primi che il terreno normale possiede una popolazione protozoaria attiva, e riuscirono ad isolare alcuni Flagellati e Amebe allo stato attivo da terreni di Rothamsted.

Secondo il CUTLER la difficoltà di vedere Protozoi attivi nell'esame a fresco del terreno dipende dal fatto che, fra le particelle di terreno e i Protozoi si stabilisce un'associazione meccanica per la quale questi aderiscono fortemente alle particelle stesse.

Anche F. M. SHERMANN ammette che nel terreno a contenuto normale di umidità esistono Protozoi attivi.

FELLER ed ALLISON trovano Protozoi attivi, benchè sempre in piccolo numero, in quasi tutti i campioni di terreno da essi esaminati.

La COPPA ha trovato parecchi Protozoi allo stato attivo nel terreno esaminato appena prelevato; però giunge alla conclusione che « i Protozoi liberi esistono nel terreno, certo però « non sempre, non in tutte le condizioni ambientali, e solamente « in minima quantità ».

SANDON trova Protozoi attivi in tutti i terreni americani da lui esaminati.

Dopo che il WINOGRADSKY gettava nel 1924-25 l'allarme sul pericolo di errate conclusioni alle quali poteva aver condotto lo studio su colture artificiali dei microrganismi del terreno, e in seguito alla sua affermazione che occorreva rivedere il lavoro fatto introducendo un metodo di studio diretto dei microrganismi del terreno, il WINOGRADSKY stesso in Francia e il ROSSI in Italia, proposero metodi per attuale tale studio diretto.

WINOGRADSKY propose:

1°) lo studio microscopico diretto dei microrganismi del suolo;

II°) colture sulla terra naturale;

III°) coltura ausiliaria su un mezzo solido imitante il suolo.

Lo studio microscopico diretto dei microrganismi del suolo, si basa sulla dissociazione, mediante rapida centrifugazione, degli elementi che formano il terreno.

Un grammo di terra fine, calcolata secca, si mette in una provetta con 4 cm.³ d'acqua distillata e poi si agita sempre nello stesso verso per cinque minuti. Poi si lascia depositare 30 secondi e si decanta il liquido superiore al deposito in una provetta di una centrifuga a mano. Si aggiunge due volte 3 cm.³ di acqua al deposito della prima provetta, si agita per ciascuna aggiunta un minuto, e poi si lascia depositare per 30 secondi, decantando in seguito nella provetta della centrifuga. Versando acqua distillata nella prima provetta, essa rimane limpida. Nella provetta della centrifuga si forma un deposito; allora si decanta la metà circa del liquido che copre questo deposito in un'altra provetta che si sottopone all'azione centrifuga. Si hanno così tre depositi e tre sospensioni dei liquidi sovrastanti i depositi.

Poichè, secondo il metodo, è bene fare un esame microscopico della sospensione della 3.^a provetta, prima e dopo la centrifugazione, si hanno in tutto, per ogni campione di terreno, sette esami microscopici diretti. Dieci minuti si impiegano nelle operazioni, e altri dieci e non più si devono dedicare alle osservazioni al microscopio.

Più recentemente del Winogradsky, il Rossi proponeva e metteva in atto nelle sue ricerche un suo metodo per l'osservazione diretta del terreno. Nei primi esperimenti egli praticava la *timbratura* del terreno mediante vetrini porta-oggetti seppelliti nel terreno. Il Rossi prendeva una coppia di vetrini l'uno aderente all'altro e li poneva ad una certa profondità in un terreno posto in vaso e setacciato in modo che avesse grana uniforme. Egli otteneva, aderenti ai vetrini, ammassi e colonie batteriche, ed anche colonie di Protozoi.

In seguito ai risultati ottenuti il Rossi concludeva che i terreni più ricchi di colonie di microrganismi sono quelli più ricchi di sostanze organiche in via di decomposizione.

In seguito il Rossi ideava un altro metodo: timbrava col vetrino una zolla tagliata dal terreno, fissando poi e colorando i microrganismi rimasti aderenti al vetrino. Seppellì anche i vetrini in piena terra e in località diverse.

È fuori di dubbio che il ROSSI, coi suoi metodi originali, ha confermato la presenza di Flagellati attivi nel terreno.

KOFFMAN per l'osservazione a fresco del terreno propone d'intaccare il vetrino porta oggetti in modo da praticarvi delle piccole incavature ove si possa attirare per capillarità, fra porta e coprioggetto, un po' di poltiglia di acqua e terreno ottenuta mediante un agitatore. Tale poltiglia si distende uniformemente su una superficie determinata del porta-oggetto, e i microrganismi in essa contenuti vengono fissati e colorati, indi studiati qualitativamente e quantitativamente. Il KOFFMAN propose come sostanza colorante dapprima la cianosina solubile in acqua e poi la cianosina solubile in alcool. Egli proponeva anche la fissazione della poltiglia, da cui prelevava una quantità determinata di essa, che poneva sul porta-oggetto, e suggeriva qualche accorgimento tecnico per una migliore distribuzione del materiale fra copri- e porta-oggetto. Con un ulteriore perfezionamento della tecnica, egli introdusse l'uso di filtri.

La fissazione della poltiglia dovrebbe, secondo il KOFFMAN, impedire lo sviluppo delle cisti e il movimento e lo sviluppo dei microrganismi in genere, permettendo così una più sicura conta diretta dei Protozoi.

Per ciò che riguarda lo studio dei preparati fatti o con poltiglia trattata con fissativi sul preparato stesso o con poltiglia trattata con fissativi prima di fare i preparati, si può fare un'osservazione importante ed è che uno stesso fissativo ha valore diverso per i diversi gruppi di Protozoi; inoltre, la pratica microscopica insegna che anche con un fissativo appropriato per ciascun gruppo o ciascuna specie, non tutti gli individui presenti vengono fissati, parecchi vengono invece distrutti. Quindi le conte fatte con poltiglia di terreno fissata devono dare verosimilmente numeri inferiori a quelli reali.

Il KOFFMAN stesso accenna a questa difficoltà tecnica e nel suo lavoro del 1931 afferma che questo diverso comportamento delle varie specie dei Protozoi di fronte ai fissativi costituisce un inconveniente piuttosto grave che può avere un grande valore per la determinazione qualitativa e quantitativa della microfauna del terreno. Egli proponeva come un miglioramento tecnico il riscaldamento del liquido fissativo. Ma numerose nostre osservazioni ci hanno dimostrato che anche con fissativi a caldo l'inconveniente non viene eliminato.

Il KOFFMAN per la determinazione specifica dei Protozoi che coi suoi metodi mette in evidenza sul terreno, si basa sui preparati fissati e colorati; ora è ben noto agli specialisti che tale metodo, se usato esclusivamente, è pericoloso, soprattutto per i Ciliati e conduce sovente a incerte o errate determinazioni. Quindi, se il metodo del KOFFMAN può considerarsi un miglioramento nella tecnica microbiologica del terreno, esso non è esente da gravi difetti, e presenta scarsa attendibilità di risultati quantitativi e qualitativi.

In complesso, coi tre nuovi metodi ora descritti gli Autori dei medesimi sono giunti a concludere che nei terreni agrari normali si trovano soltanto cisti di Protozoi (WINGRADSKY), o Flagellati attivi (ROSSI), oppure, insieme a numerose cisti, Flagellati attivi in preponderanza, Rizopodi attivi e soltanto eccezionalmente Ciliati (KOFFMAN).

Dai loro esperimenti LOSINA - LOSINSKY e P. F. MARTINOV concludono che Amebe e Ciliati allo stato attivo possono diffondersi nel terreno quando il suo contenuto in acqua sia pari almeno al 40% della capacità idrica totale.

Essi inocularono al centro di un disco di Petri contenente terra sterile, Protozoi misti a *Bacterium radicum*. Dopo qualche tempo i Protozoi erano presenti a considerevole distanza dal punto d'inoculazione.

La struttura meccanica della terra adoperata e il contenuto in acqua hanno grande importanza nella velocità di diffusione dei microrganismi. In tale diffusione i Batteri precedono sempre i Protozoi. Con un contenuto in acqua che va dal 15 al 20% (25-40% della capacità idrica del terreno), Batteri e Amebe sono attivi, ma si diffondono lentamente, più lentamente ancora i Ciliati. Con un contenuto in acqua superiore al 20% tutti i Protozoi sono estremamente attivi e si diffondono rapidamente attraverso l'intero terreno.

Metodo di conta. — I metodi più usati fino ad oggi sono quelli indiretti, cioè quelli che si basano sul computo del numero dei Protozoi ottenuti nelle colture. Fra questi metodi il più accreditato è quello delle diluizioni proposto da CUTLER e adottato da parecchi studiosi. Si prendono due campioni di 10 grammi di terreno passato al setaccio; uno serve a determinare il numero totale dei Protozoi presenti (forme attive + cisti), l'altro trattato con acido cloridrico al 2%, deve dare il numero

vitabilmente nell'altra causa di errore: lo sviluppo delle cisti. Il Winogradsky continuò quindi i suoi studi con l'osservazione diretta su placche al silico-gel.

Quanto al metodo Rossi, bisogna convenire che, usato da solo, presentandoci esso un mondo già fissato e colorato, non è sufficiente — come lo stesso Autore riconosce — alla determinazione delle specie di Protozoi del terreno.

Abbiamo anche noi cominciato le nostre osservazioni col nuovo metodo diretto della centrifugazione proposto da WINOGRADSKY, ma dopo alcune prove ci siamo persuasi della impossibilità di identificare le forme attive di Protozoi in 7 preparati microscopici voluti dal metodo nei 10 minuti che il metodo stesso concede.

Ben ponderando tutti i vantaggi e gli svantaggi dei diversi metodi sopra esposti, e tenendo presente che il fine più immediato e necessario da raggiungere era ed è, in lavori di questo genere, la sicura determinazione delle singole specie, e che soltanto su granitiche fondamenta sistematiche può costruirsi in secondo tempo un edificio di ricerche biologiche, abbiamo ritenuto di prescegliere un metodo di osservazione a fresco, diretta ed immediata, su ciascun campione di terreno appena prelevato o entro un'ora circa dal prelevamento sul campo tutte le volte che la distanza lo permetteva (terreni di marcita, brughiera e serra che avevamo a brevi distanze da Milano). E precisamente: appena giunta la zolla di terreno in laboratorio, se ne prelevavano pochi centimetri cubi e si stemperavano in un piccolo cristallizzatore sterile con tanta acqua sterile quanta ne occorreva per sommergere appena la terra adoperata. Rimescolata rapidamente la massa, si allestivano subito preparati a fresco con gocciolate della poltiglia così ottenuta. Le osservazioni non duravano più di 20 minuti.

Per i terreni di Catania, Roma e Chieti non potevamo certo fare l'esame immediato a fresco, arrivandoci i campioni spediti da quelle tre località in non meno di 24 ore. Però procedevamo ugualmente all'allestimento e osservazione dei preparati a fresco, appena giunti i campioni in Laboratorio, nel modo e nel tempo ora descritti per i terreni vicini.

Per i terreni di Catania e Roma abbiamo inoltre fatto una osservazione non priva d'importanza. Ripetendo le osservazioni a fresco anche un'ora dopo lo stemperamento in acqua, fummo

sorpresi parecchie volte nel veder un gran numero d'individui attivi di specie che di solito poi scomparivano rapidamente e che quindi non ritrovavamo più nelle successive colture. Erano sorta d'esplosioni, del resto verificate anche per i terreni di marcita esaminati poco dopo la raccolta, che davano l'idea di un terreno ancora vivo e fresco. Allo studio di queste forme apparse per esplosione dobbiamo qualcuna delle specie nuove da noi illustrate.

Con questo metodo e con sistematiche osservazioni compiute mese per mese per un intero anno, abbiamo potuto, non senza difficoltà, riconoscere un certo numero di specie allo stato attivo che elenchiamo al capitolo seguente.

Parallelamente alle osservazioni a fresco provvedevamo ad allestire colture di ciascun campione di terreno, allo scopo di ottenere lo sviluppo delle forme che si trovavano allo stato cistico per un successivo studio, nel quale sarebbero anche riapparse specie eventualmente sfuggite al primo esame a fresco. Delle colture sarà detto in apposito capitolo.

Risultati ottenuti dalle osservazioni con metodo diretto

La COPPA segnala le seguenti specie trovate a fresco nel terreno con osservazione immediata: (1)

Euglypha alveolata (terreno di marcita)

Difflugia pyriformis (terreno di risaja)

Difflugia globulus (terreno di risaja, a Fragole, a Erica)

Difflugia pristin (terreno di risaja)

Centropyxia arcolloides (terreno coltivato a Zinnie)

Monas guttula (terreno di risaja)

Euglena viridis (terreno di risaja)

Chilodon cucullus (terreno ad Erica)

Halteria grandinella (terreno di risaja e di marcita)

Gastrostyla steini (terreno di risaja).

Il NOWIKOFF cita come forme attive nel terreno umido le seguenti specie:

Colpoda cucullus, *Colpidium colpoda*, *Uroleptus musculus*, *Vorticella nebulifera*, *Pleurotricha* sp. e *Amoeba limax*.

(1) Si noti che nell'elenco figurano specie di Teelobiosi, per i quali l'A. non specifica se abbia osservato semplici gusci o forme vive.

Si noti che in questo elenco mancano completamente i Flagellati e prevalgono i Ciliati.

Le nostre osservazioni a fresco ed immediate ci hanno permesso di riconoscere le seguenti specie in forme attive, per le quali indichiamo nell'elenco i terreni in cui furono rinvenute. Osserviamo che per i Tecolobosi qualche volta si rinvenivano semplici gusci, e qualche volta forme vive ed attive.

Oicomonas socialis (marcita)
Oicomonas sp. (marcita)
Bodo sp. (marcita)
Euglena deses (marcita)
Euglena sp. (marcita)
Petalomonas mediocannellata, var. *disomata* (marcita)
Euglypha alveolata (marcita)
Euglypha laevis (marcita, serra, brughiera)
Trinema enchelys (marcita e serra)
Trinema lineare (marcita, brughiera, serra)
Trinema complanatum (brughiera)
Trinema sp. (marcita)
Microgromia socialis (brughiera)
Arcella vulgaris (marcita)
Diffugia globulus (marcita, brughiera)
Diffugia sp. (marcita)
Chilodonella cucullulus (marcita)
Chilodonella sp. (marcita)
Colpoda sp. (brughiera)
Drepanomonas revoluta (marcita)
Glaucoma scintillans (marcita)
Glaucoma sp. (marcita)
Cyclidium sp. (marcita)
Tachysoma peltionella (marcita)
Stylonychia mytilus (marcita)
Enchelyomorpha vermicularis (marcita)

Oltre a questi generi e specie che abbiamo potuto ben determinare, rinvenimmo anche diverse altre forme di Flagellati, Ciliati e Tecamebe che non ci riuscì di identificare nel rapido esame immediato a fresco, data anche la scarsità di individui (talvolta uno solo) con cui comparvero.

Vi è da osservare che la maggior parte delle forme attive

è stata trovata nei terreni di marcita, e in prevalenza nel periodo in cui la marcita è irrigata con una certa continuità (mesi invernali).

In molti esami fatti sul terreno delle aiuole del giardino del R. Istituto Superiore Agrario di Milano, tenute a prato, e in altri terreni coltivati, raramente vedemmo Protozoi attivi. Nel terreno di serra vedemmo soltanto gusci di *Testacea*.

CAPITOLO III.

Sull'esistenza di specie di Protozoi esclusivamente terricole

Al quadro dell'*edafon* appartengono forme di Protozoi che non si trovano in nessun altro ambiente?

A questo quesito la maggioranza degli Autori, fra cui molto autorevole il REICHENOW, risponde in senso negativo. Tuttavia è innegabile che esiste un gruppo di specie di Protozoi che fino ad oggi sono conosciute soltanto come abitatrici del terreno. Sono state segnalate dagli Autori che ci hanno preceduto le seguenti specie terricole:

FLAGELLATI: *Allantion tachyploon*; *Allas diplophysa*, *Colponema simmetrica*, *Phalansterium solitarium*, *Sainouron mikroteron*, *Tetramitus spiralis*, *Anisonema minus*, *Parapolytoma satura*, *Cercobobo vibrans*.

RIZOPODI: *Naegleria gruberi*, *Hartmannella hyalina*, *A. diploidea*, *A. agricola*, *A. horticola*, *A. gobanniensis*, *A. glebae*, *A. nitrophila*, *Gephyramoeba delicatula*, *Leptomyxa reticulosa*, *L. flabellata*, *Geococcus vulgaris*, *Diffugia craterella*.

CILIATI: *Enchelys tokkuri*; *Gonostomum andoi*; *Oxytricha bimembranata*; *Oxytricha proximana*; *Oxytricha lanceolata*; *Spathidium furcatum*, *Kahlia acrobates*.

Dalle nostre ricerche vengono segnalate le seguenti nuove specie abitatrici del terreno:

FLAGELLATI: *Mastigamoeba minuta*; *Mastigella mutabilis*, n. sp.; *Clamydomonas bacillaris*; *Polytoma longistigma*; *Polytoma dorsoventrale*, var. *papillatum*; *Polytoma caudatum*, var. *astigmata*, n. var.