

CAPITOLO VII.

*La sterilizzazione parziale del terreno
in rapporto ai Protozoi*

a) Storia delle ricerche precedenti

Esaminati sommariamente i risultati più importanti ottenuti dagli sperimentatori fino ad oggi con metodi diretti ed indiretti, occorre fare un passo indietro per esaminare e dare il giusto valore alla sperimentazione fatta dalla scuola inglese e americana con particolare metodo: quello della sterilizzazione del terreno.

I. - GLI ESPERIMENTI DELLA SCUOLA INGLESE. — Fra il 1909 e il 1913 RUSSELL e HUTSCHINSON, in seguito a estesi esperimenti di parziale sterilizzazione del terreno mediante vapor d'acqua e vari antisettici volatili, giungevano alle conclusioni che qui riassumiamo:

La parziale sterilizzazione del terreno produce dapprima una diminuzione, poi un aumento dei batteri, fino a un numero che supera notevolmente quello presente in origine nel terreno. Contemporaneamente vi è un aumento notevole di ammoniaca derivante dai composti organici azotati.

Il miglioramento arrecato al terreno dalla sterilizzazione parziale, è permanente, l'alto numero dei batteri permanendo anche per 200 giorni e più. E' evidente che il fattore limitante i batteri nel terreno ordinario non è batterico, nè è un prodotto dell'attività batterica, nè si sviluppa spontaneamente nel suolo.

Ma se un po' di terreno non trattato viene introdotto in quello parzialmente sterilizzato, il numero dei batteri, dopo un aumento iniziale, incomincia a diminuire. Così il fattore limitante è stato introdotto di nuovo con terreno non trattato.

E' evidente, tuttavia, che il fattore limitante del terreno non trattato, non è la mancanza di qualche cosa, ma la presenza di qualche cosa d'attivo, che non è di natura batterica, è distrutto dal calore e da sostanze tossiche, può essere reintrodotta nel terreno, nel quale è stato distrutto, con l'aggiunta di una piccola quantità di terreno non trattato, e si sviluppa più lentamente dei batteri.

« E' difficile dire quale altro agente all'infuori di un organismo vivente, possa rispondere a queste condizioni. Furono

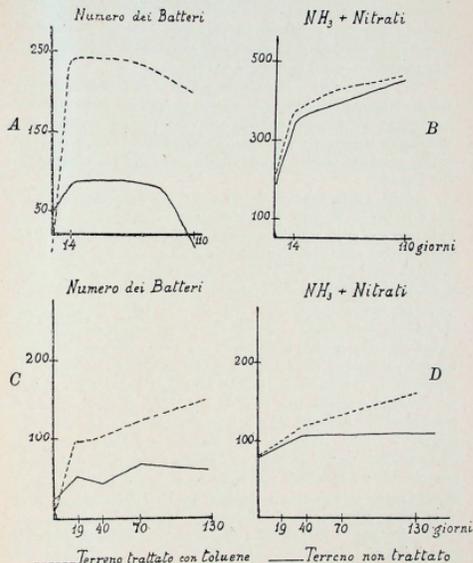


FIG. IV — Influenza del toluene sul numero dei Batteri e dell'azoto utile ($NH_3 + \text{nitrati}$) formatosi nel terreno. Le figure A e B sono tratte da un terreno avente inizialmente una grande quantità di azoto utile; le figure C e D sono tratte da un terreno nel quale trovavasi piccola quantità di azoto utile iniziale (da RUSSELL).

fatte tuttavia ricerche di un organismo di comune occorrenza capace di distruggere batteri, e si trovò un numero consi-

derevole di Protozoi. I Ciliati e le Amebe sono uccisi da una sterilizzazione parziale. Quando essi sono uccisi, si è trovato che il fattore detrimentale è privo d'azione: il numero dei batteri aumenta e mantiene un alto livello. Quando il fattore detrimentale non è privo d'azione, i Protozoi non sono uccisi. A questa regola non abbiamo trovato nessuna eccezione. »

Per trarre queste considerazioni gli Autori inglesi partono dal presupposto che i *Protozoi vivono sempre nel terreno agrario in numero tale da poter agire in esso come fattore limitante*. Non accettando questo presupposto, le conclusioni sopra riportate vanno rivedute, anche indipendentemente dalle considerazioni che seguono.

Infatti i diagrammi di fig. IV A e B che rappresentano i grafici ottenuti da RUSSEL e HUTSCHINSON misurando la quantità di batteri e di azoto utile in due campioni di terreno a forte contenuto d'azoto utile iniziale, uno trattato con toluene e l'altro no, mostrano che alla fine dell'esperimento il rapporto fra il numero dei batteri contenuti nei due terreni è da 250 a 0, mentre il rapporto fra le quantità di azoto utile ($NH_3 + NO_2$) è quasi uguale a 1. Anche osservando la fig. IV C e D, che riguarda un terreno in cui v'era una piccola quantità di azoto utile all'inizio dell'esperimento, si osserva che mentre dopo 130 giorni d'esperimento, il rapporto fra il numero dei batteri contenuti nel terreno trattato con toluene e quello non trattato è di 2,41, il rapporto fra le corrispondenti quantità di azoto utilizzabile alla fine dell'esperimento è di 1,5. Insomma, fra numero dei batteri e attività loro attribuita non vi sarebbe una diretta proporzionalità, anche ammettendo un accumulo per mancato consumo dell'azoto utile. In ogni modo, presso una parte degli studiosi dei problemi agrari, la *teoria protozoaria* del RUSSEL e HUTSCHINSON ebbe parecchia fortuna, e fu condivisa fino a tempi recentissimi da numerosi Autori.

II. - GLI ESPERIMENTI DELLA SCUOLA AMERICANA. — Parecchi sperimentatori, in seguito alla teoria del RUSSEL, ripeterono gli esperimenti di Rothamsted portando modificazioni al modo di sperimentazione. TRUFFAUT e BEZSSONOFF, CUNNINGHAM e LÖHNIS giunsero press'a poco alle stesse conclusioni del RUSSELL.

Ma le prime opposizioni del SHERMAN contro la teoria batteriofaga dei Protozoi trovarono un appoggio e un ampliamento nei lavori della scuola americana del WAKSMAN, che a New

Jersey portò a compimento nel 1923 una serie di importanti esperimenti sulla parziale sterilizzazione del terreno. Le conclusioni più importanti alle quali giunsero il WAKSMAN e lo SHARKEY sono:

1. - La parziale sterilizzazione del terreno produce un cambiamento chimico nella sostanza organica in esso contenuta, rendendola più utilizzabile come fonte di energia per i microrganismi.

2. - Una grande quantità di funghi del terreno viene uccisa dalla sterilizzazione parziale. Questo materiale morto, assieme ai corpi dei Protozoi e di altri microrganismi del suolo, uccisi dalla sterilizzazione parziale, accresce ancor più la quantità di energia utilizzabile nel suolo.

3. - Il rapido aumento nel numero dei microrganismi nel suolo si effettua a spese della sostanza organica resa utilizzabile.

4. - Il carbonio e l'azoto sono presenti nel terreno in determinata proporzione, dipendente dalla condizione fisica e chimica del terreno. Quando i composti del carbonio vengono decomposti come sorgenti di energia dai Batteri e dagli Actinomiceti, una parte dell'azoto è liberata come prodotto catabolico. Il contenuto in carbonio ed azoto nel suolo e i corpi dei Batteri, Actinomiceti e Funghi, a cui s'aggiunge l'utilizzazione economica del carbonio da parte di questi tre gruppi di organismi, deve portare alla liberazione di azoto dalla sostanza organica del suolo, con maggiore intensità di quanto non la produca lo sviluppo dei funghi.

5. - L'effettiva quantità di ammoniaca che si forma nel terreno parzialmente sterilizzato è determinata non dal numero dei Batteri e Funghi che si sviluppano nel terreno, ma dall'abbondanza della sostanza organica.

6. - I Protozoi sono soppressi nel terreno parzialmente sterilizzato, ma poi ricompaiono e diventano attivi assai prima che il numero dei Batteri diminuisca molto marcatamente.

7. - I fenomeni osservati come il risultato della sterilizzazione parziale, e propriamente l'aumento del numero dei batteri e l'accumulo d'ammoniaca sono spiegati con:

a) cambiamento delle condizioni fisiche del terreno, specialmente dei colloidi del suolo;

b) cambiamento nelle condizioni chimiche, specialmente modificazioni della sostanza organica del terreno che la rendono più facilmente utilizzabile;

c) distruzione di un gran numero di organismi del terreno, specialmente Funghi e Protozoi, che rende il loro corpo utilizzabile come fonte di energia per i microrganismi sopravvivenuti;

d) cambiamento nella bilancia della flora microbica del terreno;

e) il fatto che i Batteri utilizzano le sostanze organiche azotate e altri composti del carbonio molto antieconomicamente come sorgenti d'energia, e liberano una grande quantità di ammoniaca, insieme a fosfati ed altri sali che trovansi immagazzinati come prodotti inutilizzati nella sostanza organica del terreno.

Questi risultati sono applicabili al terreno normale. E' possibile che sotto certe condizioni si possano trovare altri fattori limitanti: ad esempio nei terreni infestati da funghi che producono malattie alle piante, nei terreni irrigati con acque luride e in quelli di serra, dove i Protozoi possono diventare un fattore limitante.

Su queste conclusioni del WAKSMAN che sono condivise da parecchi altri Autori, ritorneremo a proposito dei nostri esperimenti.

§) I nostri esperimenti

Lo scopo dei nostri esperimenti non è stato quello di controllare gli esperimenti sugli effetti della semisterilizzazione del terreno fatti da altri studiosi che giunsero a valutare la funzione dei Protozoi nel terreno soltanto indirettamente, bensì di sperimentare la loro funzione con l'osservazione diretta e con l'analisi quantitativa dell'azoto utile totale dopo un periodo di attività successivo alla semisterilizzazione; e precisamente abbiamo cercato di stabilire quale parte abbiano i Protozoi nella ammonificazione e nitrificazione che si svolgono nel terreno.

In primo luogo abbiamo scelto il terreno di marcita irrigato con acque luride, terreno fertile e molto ricco di Protozoi attivi, ed in tal numero da poter costituire, secondo alcuni, un fattore limitante. Si è stabilito di eseguire delle sterilizzazioni parziali mediante il calore, e di evitare invece quelle con antisettici di qualunque natura, e questo perchè avremmo dovuto affrontare il problema degli effetti chimici degli antisettici sui vari microrganismi e sul terreno tutto, problema chimico vastissimo che esula

dal campo delle nostre ricerche, e ci avrebbe condotto fuori di strada.

Per essere sicuri che in quei lotti dell'esperimento in cui non si sarebbero raggiunte temperature fatali a tutti i Protozoi, le specie sopravvissute si sarebbero sviluppate in numero tale da essere presto visibili ad un esame diretto ed immediato al microscopio, aggiungemmo acqua sterile ai vari lotti di terreno sottoposti a sperimentazione. Adottammo tal metodo anche perchè è noto che tanto le forme cistiche quanto quelle attive di Protozoi soccombono a temperature molto meno elevate in acqua che non allo stato di secchezza (De Rossi). Vedremo che l'aggiunta d'acqua non ha portato a risultati sostanzialmente diversi da quelli di altri studiosi.

Gli esperimenti furono condotti fra l'aprile e il luglio 1932.

Poichè gli esperimenti e gli studi precedenti avevano concentrata l'attenzione su eventuali rapporti che intercorrono fra Protozoi e Batteri nella mineralizzazione delle sostanze organiche azotate, abbiamo stabilito di assumere quale indice della mineralizzazione in atto la produzione di NH_3 e di NO_2 e non già lo sviluppo numerico dei Batteri.

Eseguiamo 3 serie di esperimenti. Per ogni serie si prelevavano da un'unica zolla di terreno, dopo stacciatura, i vari lotti di terra da sottoporre al trattamento mediante calore, e quelli da servire per controllo.

Ciascun lotto di terra stacciata, pesato esattamente in 300 gr., veniva posto in cristallizzatore sterile, e vi si aggiungevano 700 gr. d'acqua sterile, dimodochè la terra veniva imbibita e sommersa sotto uno strato d'acqua pressochè uguale in tutte le vaschette.

Come si rileva dagli specchietti, le temperature a cui soggiornarono le vaschette e il divario fra la minima e la massima temperatura a cui furono mantenute, furono diversi per ciascuna di esse, e ciò fu fatto per poter giungere ad una completa sterilizzazione da Protozoi in alcune vaschette e ad una sterilizzazione parziale da Protozoi in altre.

Mentre per il primo scopo aggiungevamo tutti i 700 cm.³ d'acqua prima di iniziare il riscaldamento, ottenendo così, durante il medesimo, movimenti convettivi nella massa terrosa e liquida sufficienti per mantenere piccolo il divario fra la massima e la minima nei diversi punti della massa; per il secondo

scopo invece, volendosi mantenere assai più ampio il divario fra massima e minima nei diversi punti, aggiungevamo 400 cm.³ d'acqua prima del riscaldamento e gli altri 300 cm.³ dopo eseguita tutta l'operazione del riscaldamento. Abbiamo scelto questa via per lasciar libero giuoco alle specie proprie del terreno di marcia e che eventualmente potessero sopravvivere in esso. Non adottammo il metodo usato da altri ricercatori di sterilizzare preventivamente i recipienti col terreno e introdurvi poi determinate specie di Protozoi, perchè in tal modo ci si allontana troppo dalle condizioni naturali del terreno, e si può ottenere artificialmente in un terreno lo sviluppo di specie che normalmente in esso non vivono. Inoltre, essendo sommamente difficile avvalersi, per l'innesto nel terreno dell'esperimento, di colture pure di Protozoi libere da Batteri, ed usando di solito colture normali di Protozoi, si viene ad innestare con questi, nel terreno dell'esperimento, oltre ai Protozoi anche Batteri.

I risultati in cifre assolute dei nostri esperimenti sono rappresentati nelle tabelle A, B, C.

Le esperienze di semi-sterilizzazione (uccisione dei Protozoi) riescono bene soltanto osservando molte condizioni. Una seria difficoltà consiste nell'impossibilità di ottenere nei campioni di terreno una temperatura assolutamente uguale in tutti i punti della massa terrosa, tenuta presente la necessità che l'operazione deve esser compiuta entro ristretti limiti di tempo.

Noi abbiamo ottenuto di contenere le oscillazioni di temperatura fra i diversi punti (prossimi alla superficie o al fondo o alla parete) entro limiti relativamente ristretti (da 5 a 10 gradi fra massima e minima), adoperando vasi larghi e poco profondi, in cui ponevamo 300 gr. di terreno che occupavano i primi 3 cm. di altezza circa, e aggiungendo 700 cm. cubici di acqua, in maniera che questa, oltre ad imbibire tutti gli spazi capillari del terreno sommerso, sovrastava sulla superficie del terreno per un altro strato di circa 2 cm. In tal guisa si è potuto ottenere che, mantenendo l'ambiente del termostato a circa + 92°C, si poteva raggiungere rapidamente, com'era necessario, una temperatura che in nessun punto della massa terrosa era inferiore a + 62° e in nessun punto era superiore a + 72° (esperimento P, tabella C) o rispettivamente non inferiore a + 65° nè superiore a + 70° (esperimento G, tabella B). Mantenendo tali temperature per 30 minuti primi, si ebbe l'uccisione di tutti i

Protozoi del terreno, comprese le cisti. Evidentemente la temperatura fatale anche ai più resistenti Protozoi dei terreni da noi studiati, nelle condizioni di sommersione in acqua e di 30 minuti di trattamento, è compresa entro i limiti di + 62° a + 72° C. Non abbiamo voluto in nessun lotto di terreno raggiungere temperature troppo superiori a + 70° C. nè prolungare oltre 30 minuti i trattamenti, perchè è da ritenere che a tali temperature e con trattamenti più lunghi si alteri troppo profondamente la struttura chimico-fisica di alcuni costituenti del terreno; non solo, ma è noto che da + 70° a + 75° C. si sopprimono la maggior parte di forme attive dei batteri, e a temperature più elevate possono soccombere anche le spore.

Nell'esperimento N (tabella C) e H (tabella B) sono sopravvissute alcune specie di Amebe, benchè il terreno abbia subito temperature fra + 65° e + 75° C. e fra + 62° e + 68° C. È da ritenere che tale sopravvivenza sia dovuta ad eccezionali resistenze delle cisti di queste Amebe, resistenze già conosciute e segnalate, per le Amebe in generale, da precedenti sperimentatori, salvo qualche specie di Ameba più vulnerabile.

Insistiamo sul fatto che una temperatura uguale in tutti i punti della massa terrosa non si può ottenere, (1) data la necessità di portare rapidamente la massa e il suo recipiente ad elevata temperatura e di far durare pochi minuti il soggiorno alla temperatura voluta.

D'altra parte teniamo a ben mettere in evidenza che *lo scopo dei nostri esperimenti non era quello di stabilire qual fosse la precisa temperatura fatale a ciascuna specie o famiglia o classe di Protozoi, bensì quello di studiare la loro funzione nel terreno;*

(1) Date queste difficoltà, si può ben immaginare con quanta circospezione si debbano accogliere le affermazioni di alcuni Autori che assicurano potersi sterilizzare da Protozoi il terreno agrario in natura, mediante getti di vapore da intettare negli strati superficiali.

Si comprende altresì come in qualcuno dei nostri lotti di terreno sottoposti al calore abbia potuto apparire, alle prime osservazioni, come sicuramente raggiunta l'uccisione completa di tutti i Protozoi, ed abbiamo potuto ritenere che la massa terrosa e l'acqua sovrastante avessero superato in ogni punto la temperatura fatale anche ai più resistenti di essi; ma in realtà in qualche caso ciò non si era verificato, come p. es. per le Amebe sopravvissute nei due lotti sopraccennati; basta infatti che poche forme cistiche si trovino in punti che non raggiungono la temperatura fatale, o la raggiungono solo per brevi momenti, perchè poi, entro alcuni giorni, le specie corrispondenti si riproducano in individui numerosi.



e quindi noi abbiamo voluto ottenere ed abbiamo ottenuto lotti di terreno in cui tutti i Protozoi furono uccisi e restarono vivi i batteri, ed altri in cui sopravvissero tutti i Protozoi o parte di essi, insieme ai batteri.

Mantenendo l'escursione tra la temperatura minima di +58° e massima di +77° C., o rispettivamente +48° e +63°, non solo non si uccidono i Protozoi, ma essi si sviluppano e si moltiplicano in quantità grandissima, quasi fossero su terreno di coltura; e la differenza spicca enormemente in paragone del controllo (terreno identico trattato con acqua sterile, esaminato a fresco).

Nelle analisi abbiamo anche voluto tener conto degli aminoacidi come sostanze di prossima scomposizione e utilizzazione.

In tutti i nostri vasi degli esperimenti non osservammo mai sviluppo di altri microrganismi all'infuori di Batteri e Protozoi, cosicchè ogni fattore estraneo a questi due viene eliminato dalla discussione (V. precedentemente le conclusioni del WAKSMAN).

Provvedemmo anche ad aereare le capsule mediante uno speciale sistema di copertura che ci garantiva da qualsiasi inquinamento di Protozoi dall'esterno, permettendo un leggero afflusso di aria.

Gli esami microscopici dei lotti per riscontrare la presenza o l'assenza di Protozoi e per riconoscere generi e specie che rapidamente erano riconoscibili, furono fatti a distanza di 4 o 5 giorni l'uno dall'altro.

Nelle tabelle seguenti, che raccolgono i risultati degli esperimenti e delle analisi, abbiamo adottato, per la presenza dei Protozoi, le diciture: *scarsi, numerosi, numerosissimi*, dato che un metodo sicuro di conta, come dicemmo in principio, non esiste per i Protozoi del terreno, e quindi riteniamo assai più sicuro basarci sulla ricchezza complessiva di forme vive ed attive direttamente osservabili.

Discussione. — Dall'esame delle tabelle B e C si viene alla conclusione che per quei lotti trattati col calore (lotti G. H. N. P) ove i Protozoi mancano, o sono rappresentati da sole Amebe, si ha uno sviluppo di una maggior quantità di NH₃, in confronto ai lotti, pure trattati col calore, e contenenti, oltrechè Amebe, anche Ciliati e Flagellati (lotti I.O).

Dalla tabella C si rileva che il guadagno in azoto utile verificatosi alla fine del periodo dell'esperimento, non è trascurato.

TABELLA A
Esperimento sul terreno l° prelevato in Cascina del Bosco (Milano)
(Durata dell'esperimento: 2 maggio - 2 giugno 1932)

Lotti ricavati da un'unica zolla di terreno stacciato	Per 1 Kg. di terreno milligr. di:						Protozoi riscontrati presenti con osservazioni a fresco
	Azoto totale	Azoto ammoniacale	Azoto nitrico	Azoto degli amminozidi	Azoto totale utile		
A 300 gr. di terreno dati all'analisi senza alcun trattamento il 2-V-1932.	7.600	—	47,0	4,08	51,08	Ciliati scarsi Flagellati scarsi	
B 300 gr. di terreno + 700 gr. d'acqua sterile, senza riscaldamento.	8.020	7,29	4,71	—	12,00	Flagellati (numerosi) Ciliati (<i>Euplates charon</i> in prevalenza, ma in genere scarsi tutti i Ciliati).	
C Riscaldato fra +40° e +65° C. 300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile.	8.040	6,15	3,75	—	9,90	Flagellati (non molto numerosi).	
D Riscaldato fra +50° e +65° C. 300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile.	8.070	1,71	4,71	5,00	11,42	Flagellati Ciliati numerosi (<i>Colpoda</i> sp. e <i>Stylonychia</i> sp.)	
E Riscaldato fra +58° e +77° C. 300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile.	7.800	3,14	10,72	11,5	25,36	Flagellati numerosi (alla fine predomina il <i>Polytoma uvela</i> e <i>Mastigamoeba</i> sp.) Amebe numerose Ciliati (<i>Colpoda</i> numerosi, <i>Stylonychia</i> , ecc.).	

NOTA — L'azoto organico venne dosato secondo il metodo di Kjeldahl. L'azoto nitrico venne determinato secondo il procedimento di K. Ulech al ferro ridotto operando sull'estratto acquoso del terreno. Sempre sull'estratto acquoso ai esegui anche la determinazione dell'azoto ammoniacale per distillazione in presenza di MgO, e dell'azoto amminico secondo il metodo di Sørensen al formolo.

TABELLA B

Esperimento sul terreno 1° prelevato in Cascina del Bosco (Milano)

(Durata dell'esperimento: 28 maggio - 28 giugno 1932)

Lotti ricavati da un'unica zolla di terreno stacciato	Per 1 Kg. di terreno milligr. di:					Protozoi riscontrati presenti con osservazioni a fresco
	Azoto totale	Azoto ammoniacale	Azoto nitrico	Azoto degli amminocidi	Azoto totale utile	
F <i>Terreno dato all'analisi appena raccolto 300 gr.</i>	13,900	5,05	4,04	1,18	10,27	Cisti
G <i>Terreno riscaldato fra + 65° e + 70° C. (300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile).</i>	13,980	49,80	26,59	—	76,39	Nessun Protozoo
H <i>Terreno riscaldato fra + 62° e + 68° C. (300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile).</i>	14,000	28,60	19,44	—	48,04	Amebe numerose (10-12 giugno) Scarse il 28 giugno
I <i>Terreno riscaldato fra + 48° e + 65° C. (300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile).</i>	13,800	25,74	32,80	5,00	63,54	Flagellati numerosi Ciliati numerosi (<i>Cyrtolophosis mucicola</i> e <i>Stylonychia</i>)

TABELLA C

Esperimento sul terreno 1° prelevato in Cascina del Bosco (Milano)

(Durata dell'esperimento: 14 giugno - 14 luglio 1932)

Lotti ricavati da un'unica zolla di terreno stacciato	Per 1 Kg. di terreno milligr. di:					Protozoi riscontrati presenti con osservazioni a fresco
	Azoto totale	Azoto ammoniacale	Azoto nitrico	Azoto degli amminocidi	Azoto totale utile	
L <i>Terreno dato all'analisi appena raccolto 300 gr.</i>	5,950	—	12,15	2,86	15,01	Flagellati (scarsi) e Rizopodi (osservazioni a fresco).
M <i>300 gr. di terreno + 700 gr. d'acqua sterile, senza riscaldamento.</i>	6,030	—	6,57	1,43	8,00	Rizopodi scarsi Flagellati scarsi Ciliati scarsi
N <i>Riscaldato fra + 65° e + 75° C. 300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile.</i>	5,950	10,00	8,45	3,72	22,17	Verso la fine dell'esperimento presenti piccole e numerose Amebe.
O <i>Riscaldato fra + 48° e + 65° C. 300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile.</i>	6,050	—	8,60	3,43	12,03	Amebe scarse Ciliati scarsi (<i>Cyrtolophosis mucicola</i> prevalente) Flagellati scarsi
P <i>Riscaldato fra + 62° e + 72° C. 300 gr. di terreno + 700 gr. di acqua sterile.</i>	6,050	7,45	6,45	—	13,90	Nessun Protozoo

rabile per il lotto N, ove si è riscontrato un grande sviluppo di Amebe verso la fine dell'esperimento. Per gli altri lotti (O e P) della tabella C, pur avendosi in entrambi una perdita in azoto totale utile, rispetto al controllo (lotto L), la perdita però non ci sembra di tale entità da autorizzarci a trarne delle conclusioni.

Osservando invece la tabella B, si nota un forte guadagno in azoto utile, rispetto a quello del controllo, alla fine dell'esperimento, per tutti i terreni trattati col calore, che abbiano o no, durante la prova, rivelato la presenza di Protozoi. Il massimo guadagno di azoto utile totale si rileva nel lotto G, ove i Protozoi mancano completamente.

Soprattutto risulta ben netto, comparando i dati delle tabelle B e C, che un notevole guadagno in azoto totale utile, al termine dell'esperimento, si ha soltanto nei lotti della tabella B, costituiti da terreno inizialmente ricco di sostanze organiche azotate. La notevolissima differenza di ricchezza (tabelle B e C) in azoto totale iniziale (che è in gran parte organico) si spiega col fatto che nelle marcite milanesi, irrigate con acque di fogna, dopo il lungo periodo jemale di irrigazione, si alternano periodi di prosciugamento quasi totale, con periodi di sovrabbondante irrigazione per scorrimento di acque luride, e quindi con apporto — in tali periodi — di grandi quantità di sostanza organica azotata che trovasi già in stadi di avanzata decomposizione.

Se ora, invece di considerare il contenuto in ammoniacale dei terreni sperimentati, ci rivolgiamo al contenuto in NO_3 , rileviamo che nei terreni della tabella A (lotti B, C, D, E) e della tabella C (lotti M, N, O, P) si ha nella prima una notevole perdita dell'azoto nitrico iniziale, e nella seconda una perdita notevolissima del medesimo, ci siano o no i Protozoi, mentre osservando la tabella B si nota un aumento considerevole dell'azoto nitrico nei lotti G, H, I, rispetto al controllo (lotto F). La quantità di azoto nitrico prodotto sembra indipendente dai limiti di temperatura entro i quali furono riscaldati i vari lotti, mentre invece in tutte le tabelle i valori massimi di NO_3 , per i lotti trattati col calore, si hanno in tutti i lotti che contengono Ciliati.

Ci sembra di poter dedurre che l'unico risultato delle nostre analisi riconducibile verosimilmente alla presenza o as-

senza di Protozoi di vari gruppi nei terreni trattati, sia il rapporto fra la quantità di NH_3 e quella di NO_3 in essi riscontrata alla fine dell'esperimento. I dati che precisano tale rapporto sono rappresentati nel grafico di Fig. V.

I rapporti desunti dalle tre tabelle sono rappresentati nella seguente:

TABELLA D
Rapporto fra NH_3 e NO_3 alla fine degli esperimenti

Terreni senza Protozoi	Terreni con Amebe	Terreno con Flagellati	Terreno con Ciliati (scarsi) + Flagellati (numerosi)	Terreno con Ciliati (numerosi) + Flagellati (scarsi)	Terreno con Amebe + Flagellati + Ciliati (numerosi)	Terreno con Amebe (scarse) + Flagellati (scarsi) + Ciliati (scarsi)
1,80	1,47	1,64	0,78	0,35	0,27	0
1,15	1,18					

Da questa tabella è ricavato il diagramma di fig. V.

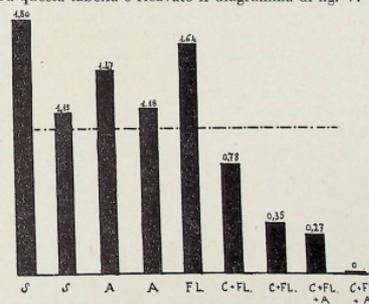


FIG. V — Rappresentazione grafica dei rapporti fra NH_3 e NO_3 nei diversi lotti di terreno trattati col calore.

$\frac{\text{NH}_3}{\text{NO}_3} = 1$; S, lotto senza Protozoi; A = Amebe; FL = Flagellati; C = Ciliati. I numeri alla sommità delle striscie nere indicano il rapporto fra NH_3 ed NO_3 nei diversi lotti trattati col calore.

Dall'esame della tabella D e dal grafico di fig. V si rileva che, nei lotti di terreno trattati col calore, il rapporto fra NH_4 ed NO_3 è superiore all'unità nei terreni senza Protozoi o con sole Amebe o con soli Flagellati, mentre è inferiore all'unità in tutti quei lotti in cui i Ciliati sono presenti. Ciò dimostra che, *anche in condizioni sperimentali di semisterilizzazione, i Ciliati accompagnano intensi processi ossidativi della sostanza azotata nel terreno.* A questo fatto fa riscontro il complesso dei nostri reperti faunistici in natura, (v. tabella a pag. 72) da cui risulta che nei terreni di marcita irrigati con acque molto luride (terreno I) vi è pressochè uguale ricchezza di specie di Ciliati e di Flagellati con preponderanza numerica individuale di questi ultimi, e trattati di un terreno che forma il F° quadro di una marcita nel quale come è noto (v. analisi a pag. 73), il processo di ossidazione è all'inizio. Per converso nel terreno III si hanno Ciliati in grandissima prevalenza sui Flagellati, tanto per frequenza d'individui come per numero di specie, e trattati del quadro 5° di una marcita irrigata anch'essa con acque luride, nel quale i processi ossidativi sono assai più avanzati ed intensi che nel F° quadro. Da questa concordanza fra i risultati dei nostri esperimenti e i nostri reperti faunistici basati su lunghe e sistematiche osservazioni, ci sembra di poter desumere, come ipotesi di lavoro, che *molto verosimilmente i Ciliati terricoli saprobi non solo accompagnano i processi ossidativi, ma vi partecipano attivamente.*

L'ipotesi concorda con le osservazioni del KOLKWITZ, di WAGNER e EMMA HAMBURG-EISEMBERG sulla presenza di diverse specie di Ciliati nei fanghi attivati e di CRABTREE sui Protozoi dei letti batterici e sul presumibile rapporto di questa fauna di Infusori con il processo di purificazione delle acque luride.

Abbiamo prescelto, per approfondire le osservazioni e per condurre i nostri esperimenti, il terreno di marcita, appunto perchè, trattavasi di accertare la funzione particolare di microrganismi che la esplicano in grado massimo nell'ambiente delle acque luride. Ed è noto del resto che i Ciliati terricoli sono essenzialmente saprobi, e gran parte di essi sono abitatori tanto del terreno agrario ordinario quanto della marcita. In simili fatti biologici la scelta del caso estremo conduce alla maggiore facilità di accertamento. In tal modo, con le nostre ricerche,

lo studio della funzione particolare dei Ciliati terricoli saprobi è stato portato su un terreno agrario tipico (marcita), e i risultati di questo studio, assai incoraggianti, hanno permesso di estendere la ricerca ad altri terreni agrari, giustificando l'ipotesi che la funzione dei Ciliati terricoli saprobi possa ritenersi estesa a tutti i terreni agrari normali, benchè in misura variabilissima.

Se l'ipotesi è giusta, ne deriverebbe come corollario che *la ricchezza qualitativa e quantitativa in Ciliati terricoli saprobi potrebbe essere assunta come indice della intensità dei processi ossidativi dei prodotti della decomposizione della sostanza organica azotata, semprechè il giudizio sulla ricchezza in Ciliati sia dato mediante osservazioni dirette del terreno a fresco o di colture in acqua sterile.*

Le differenze dei risultati dei diversi studiosi sui Protozoi del terreno si potrebbero allora spiegare per il fatto che ciascun ricercatore ha segnalato le specie che riscontrava in terreni svariatisimi senza indagare se e quale rapporto potesse intercorrere fra gruppi ecologici di specie di Protozoi e il grado di intensità dei processi ossidativi dei prodotti di decomposizione della sostanza organica azotata.

Durante la revisione delle bozze di questo lavoro ci è pervenuto il recentissimo lavoro del KOFFMAN sulla microfauna del terreno in rapporto agli altri microrganismi terricoli e in rapporto ai processi microbiologici del terreno stesso. L'A. ha compiuto degli esperimenti di semi-sterilizzazione del terreno col calore e con antisettici: in molti di questi esperimenti i Protozoi che egli aggiungeva ai terreni sterilizzati dimostrarono un'azione favorevole ai processi di mineralizzazione delle sostanze azotate, e in modo speciale nettamente favorevole ai processi di nitrificazione. L'Autore però non specifica se egli abbia usato Protozoi tratti da colture pure libere da Batteri; anzi è lecito supporre che coi Protozoi introducesse anche Batteri nei suoi terreni d'esperimento, perchè traeva il materiale da innesto da colture ordinarie di Protozoi in brodo di fieno sterile.

Infine merita di essere rilevato il fatto che l'unico dei nostri lotti sperimentali che abbia dato all'analisi un alto contenuto di aminoacidi al termine dell'esperimento (Tabella A, Lotto E) è altresì l'unico nel quale si è sviluppato in grande quantità il *Polytoma uvella*, che è una specie ad alimentazione diffusa.