

SNT 3020
Arsenico - composti fissi

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

AZIONE DI ALCUNE MUFFE

SUI

COMPOSTI FISSI D'ARSENICO

DEL

Dott. B. GOSIO

Perito medico igienista ed assistente ai laboratori scientifici

CON TAVOLA ILLUSTRATIVA



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE

1892



11415

MINISTERO DELL'INTERNO

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ

AZIONE DI ALCUNE MUFFE

SUI

COMPOSTI FISSI D'ARSENICO

PER

Dott. B. GOSIO

Perito medico igienista ed assistente ai laboratori scientifici

CON TAVOLA ILLUSTRATIVA



ROMA

TIPOGRAFIA DELLE MANTELATE

1892

11294
(170)

19513

LABORATORI SCIENTIFICI DELLA DIREZIONE DI SANITÀ
(MINISTERO DELL'INTERNO)

AZIONE DI ALCUNE MUFFE SUI COMPOSTI FISSI D'ARSENICO (*)

per

Dott. B. GOSIO

Perito medico igienista ed assistente ai laboratori scientifici

Nella storia degli avvelenamenti per arsenico appaiono abbastanza frequenti i casi in cui l'effetto tossico si produsse per le vie respiratorie: qualche volta fu anche ben noto il meccanismo con cui si effettuò la produzione del veleno; così nei casi curiosi di Leopoldo I e Giuseppe II che inalarono i prodotti della combustione di candele contenenti anidride arsenica (1): era qui evidente trattarsi di una riduzione del composto analoga a quella che si può ottenere per riscaldamento su carbone, riduzione che nel caso delle candele può, secondo Hasselt, anche risalire alla formazione di veri composti gassosi. Altrettanto dicasi di tutti quei casi in cui per circostanze speciali era ben definita la natura del gas che dovette penetrare nel polmone, come negli avvelena-

CENNI STORICI.

(*) Di questo studio venne già fatta una comunicazione preventiva con esposizione di preparati nell'ultimo Congresso d'igiene tenutosi a Londra.

menti da idrogeno arsenicale sviluppato in ispeciali industrie (*) o a scopo di ricerca scientifica (**).

Ma molte altre volte fu arduo lo stabilire in che forma il veleno fosse penetrato; ed anche prescindendo dalla pretesa scientifica di voler caratterizzare il composto, fu già molto difficile chiarire se si trattasse di particelle minutissime della sostanza primitiva, ovvero se avesse avuto luogo una trasformazione del veleno solido in veleno gassoso. — I dubbi e le controversie vengono precisamente a sorgere là dove più s'interessa l'igiene: così è noto il danno che deriva a chi soggiorna in ambienti tappezzati con carte ed arazzi a colori arsenicali (verde di Scheele — verde di Schweinfurt); è noto il pericolo a cui espone la sola presenza di sostanze contenenti arsenico. Eppure sul meccanismo intimo con cui i composti d'arsenico vengono a rendersi nocivi anche a distanza, restavano molto incertezze; e in certi punti perfetta oscurità. Ne è questa una questione da trascurarsi fidandoci nel pensare che le tappezzerie a colori arsenicali non sono più oggi in uso; inquantochè è dimottrato che arsenico si contiene con estrema facilità in quasi tutti i colori di qualità inferiore; molti colori bianchi contengono arsenico in quantità non inferiore ai verdi: dicasi altrettanto del bleu di cobalto, dei colori rossi e bruni, ecc. (2).

La sorveglianza delle autorità (come fanno vedere le recenti inchieste praticate in Inghilterra) ha bensì fatto scomparire l'abuso di certi colori che più destavano sospetto (verde Scheele-verde Schweinfurth); ma ad ogni modo o sotto forma di miscele o con attenuazione delle tinte per mezzo di molteplici artifici, essi vengono sempre impiegati: e l'arsenicismo domestico è anche oggidì il

(*) Un esempio tipico a questo proposito è quello citato nel *Journ. de Pharm. et de Chim.*.... (t. 13, p. 626). — L'officina Durand e Huguenin di Basilea, nella preparazione dell'anilina dalla nitrobenzina, si serviva tempo fa per la produzione dell'idrogeno di un acido cloridrico tedesco, proveniente da Giessen o preparato con acido solforico ottenuto da calcopiriti fortemente arsenicali. Nel corso della fabbricazione dell'anilina il cloruro d'arsenico contenuto nell'acido cloridrico impiegato si trasformò in idrogeno arsenicale ed avvelenò cinque operai che solo con grande difficoltà poterono salvarsi dalla morte.

(**) Così nel caso del prof. Gehlen di Monaco, il quale morì in nove giorni per aver inspirato una quantità d'idrogeno arsenicale corrispondente ad $\frac{1}{100}$ di grano d'arsenico (Brandes). — Anche altri chimici ebbero a soccombere per aver respirato di questo gas.

più sovente prodotto dalle carte di tintura. Il professor di chimica del collegio dei chirurghi in Irlanda (3) mostra coi fatti come nelle carte, dove i colori verdi e rossi sono molto attenuati ed ugualmente nelle carte di altro colore possa trovarsi arsenico: egli cita il caso di una famiglia inglese, che ebbe gli effetti di un avvelenamento caratteristico poco dopo aver preso possesso di una casa. I rilevati per ordine dell'autorità giudiziaria i campioni delle varie tappezzerie, di sette, sei furono riconosciuti arsenicali, senza che all'apparenza ne mostrassero il sospetto. I sintomi dell'intossicazione cessarono subito che quella famiglia abbandonò la casa.

Anche in Francia il dott. Layet (4) ha testè fatto vedere la possibilità di consimili danni: egli stesso ne fu una vittima, perchè ebbe a risentire marcati effetti dalla presenza d'arsenico nella tappezzeria del suo studio; e su 50 campioni di carta comprata a Bordeaux ne trovò tre arsenicali.

Egli è ben vero che oggidi si ottengono magnifiche colorazioni per mezzo di derivati dell'anilina; ma questi hanno lo svantaggio di deteriorarsi per l'azione della luce, sicchè coll'arsenico si continua a colorire tappeti, carte, toelette da ballo, fiori artificiali, ecc. (5).

Non deve poi dimenticarsi che arsenico si può trovare indirettamente per l'applicazione di speciali mordenti: così per fissare la corallina, rosso magnifico molto usato nell'arte tintoria, certe fabbriche si servono come di mordente dell'arseniato di alluminio (6). — Fra i più efficaci fissatori dei mordenti poi filati figura l'arseniato di sodio (7). Indipendentemente poi da contraffazioni o da impossibilità di purificare i prodotti commerciali, può il veleno trovarsi diffuso negli ambienti appunto perchè vi fu posto in buona fede: spesso vediamo aggiungere arsenico alla colla ed ai mastici per impedirne la fermentazione; ci è noto l'uso che si fa dell'acido arsenico per preparare paste o carte contro i topi e gli insetti; ci è nota la pratica dell'imbalsamazione in cui si utilizzano le proprietà antisettiche dei composti arsenicali per salvare i tessuti organici dalla putrefazione..... Tutti questi fatti portano a ritenere che non per l'aumentato rigorismo delle odierne leggi sanitarie in tutti gli Stati viene ad escludersi la possibilità che si trovino composti arsenicali a contatto degli arredi domestici ed il pericolo che ne può derivare.

Poco poi ci assistono le leggi per quello che riguarda gli abusi degli anni passati; sicchè noi ci troviamo a subire le conseguenze di ciò che fu tollerato dai nostri padri. Una volta introdotta una tappezzeria arsenicale in una camera, non cessa il pericolo pel volgere degli anni: non cessa neppure ove quella venga ricoperta con altra carta (8). Risulterà dalle mie indagini che *esistono dei germi capaci di scomporre energicamente i preparati fissi di arsenico con produzione di gas velenosi*. Se pertanto uno di questi germi viene a trovare condizioni favorevoli per svilupparsi a contatto dei colori arsenicali diffusi sulle pareti di un ambiente, da quel giorno la salute di chi vi abita è minacciata. E tanto più sono questi fatti insidiosi, in quantochè si aveva avuto il controllo di molti anni trascorsi senza alcun disturbo.

*

STATO ATTUALE DEL-
LA SCIENZA.

Lo stato attuale della scienza in questa questione, per ciò che si riferisce alla mia tesi, può essere riassunto in breve. La discussione e le ricerche furono soprattutto riferite all'avvelenamento che si produce per le tappezzerie a colori d'arsenico, giacchè questo era il caso più comune a verificarsi in pratica; e gli osservatori si divisero in due scuole: l'una ammette con Selmi, Roscoe e Schorlemmer (9) la produzione di gas tossici per effetto della vegetazione delle muffe a contatto coll'arsenico; l'altra sostiene con William Forster (10) che in ogni caso la ragione della tossicità dell'aria inspirata è da cercarsi nel pulviscolo che si elimina dalle tappezzerie.

Anzitutto l'abbracciare in senso assoluto l'opinione del Selmi non può essere a priori giustificato. — Siccome un avvelenamento da pulviscolo di metalli tossici è in modo generico ammesso, nulla osta che nel nostro caso speciale il pericolo provenga dal colore stesso eliminato e sparso negli ambienti: soprattutto è da supporre che ciò succeda in determinate condizioni di siccità delle pareti domestiche. — Troppi fatti provano la possibilità di questa forma d'avvelenamento: gli eritemi a cui vanno soggetti gli operai delle industrie colorarie, le blefariti, congiuntiviti e corizze verificatesi in persone che abitavano camere tappezzate con carte arsenicali,

devono verosimilmente addebitarsi all'azione diretta e locale di minime particelle del veleno, anziché ad un assorbimento generale.

Il compito dei ricercatori doveva pertanto essere solo quello di dimostrare: se oltre all'avvelenamento da pulviscolo arsenicale (che certamente deve essere meno efficace) poteva verificarsene anche uno gassoso; nell'affermativa, quale ne fosse la natura, il meccanismo di produzione e quale delle due forme di avvelenamento avesse maggiore probabilità di avverarsi.

Il risolvere questi punti significava portare anche un importante contributo ad una questione di tossicologia; ripetute esperienze sulla tolleranza dei composti arsenicali per parte degli organismi dimostrano che la suscettibilità varia col variare della forma sotto cui il veleno è assorbito. Allo stato di polvere il veleno è molto meno attivo che allo stato gassoso: di più contro il pulviscolo l'organismo dispone di mezzi protettivi (ciglia vibratili) che non ha contro i gas. — A tale questione si riferiva poi l'altra delle diverse forme d'avvelenamento, che ebbero a verificarsi: in molti casi difatti si notarono gravi sintomi di arsenicismo, senza alcun fenomeno locale che indicasse una lesione immediata.

*

Il contributo scientifico diretto ad illustrare questa questione non fu tale da dissipare ogni controversia.

Che per la vegetazione dei saprofiti a contatto con composti fissi d'arsenico possano svilupparsi gas tossici dovevasi (almeno in modo generico) già ammettere: e qui la teoria del Selmi ha trovato validi appoggi. Si comincia dall'accertare che l'arsenico è tollerabile dai saprofiti (Joannsohn (11) — Binz (12)) e a dissipare la vecchia credenza che *dove c'è arsenico non può avvenire putrefazione*; e poi si passa anche a provare una vera trasformazione provocata dai germi stessi sui composti del metalloide: Hamberg (13) fa putrefare dei liquidi contenenti arsenico, e trova arsenico nei gas che si svolgono pel processo putrefattivo. — Flück (14) mescola composti d'arsenico alla colla-mastice e dimostra che si sviluppa col tempo idrogeno arseniato: in ciò egli dà importanza all'azione riduttiva della sostanza organica; ma viceversa è ovvio pensare ad un processo putrefattivo, per cui si richiama alla mente il meccanismo biologico dei germi.....

Un caso poi di speciale interesse, soprattutto perchè permetteva già di fissare l'attenzione su un agente probabile delle trasformazioni sopra dette, fu quello occorso a Carlo Bischoff (15). Egli racconta che venne chiamato quale perito nella constatazione di un avvelenamento a cui, per vendetta, era stato soggetto un cavallo. Si trattava di un avvelenamento da acido arsenico mescolato insieme al foraggio. Oltrechè dimostrare l'arsenico nel cadavere, Bischoff dovette dimostrarlo anche nel cibo, che consisteva in una miscela di diverse farine: avena, mais e ceci. Lungo le esperienze, che dovettero durare parecchi giorni, gran parte della farina avvelenata venne mantenuta in un bicchiere all'aria aperta. Trascorsa qualche settimana si vide una rigogliosa vegetazione di muffe sulla superficie della farina, intanto che un acuto odore di aglio avvertiva dello sviluppo di gas arsenicale. L'autore conchiude che le muffe riducevano l'acido arsenico; e, avendo osservato che alcune cartoline al nitrato d'argento esposte al di sopra del bicchiere annerivano, ammise che si trattasse di idrogeno arsenicale.

Tralascio per ora di discutere sulla garanzia che in tali casi possa dare questa reazione all' AgNO_3 per l'idrogeno arsenicale; non v'ha dubbio che essa può essere mentita per la presenza di molti altri composti riducenti, come avrò occasione di dimostrare quando parlerò dei metodi di ricerca; ad ogni modo l'odore agliaceo era già per sè manifesto segno della emanazione di un prodotto arsenicale gassoso; e la teoria di Selmi non poteva avere conferma migliore nè più degna di menzione.

Ma le difficoltà sorgono tosto che da così fatte osservazioni si vogliano trarre dei corollari.

Il fatto citato da Bischoff è certo il più classico che a tale proposito registri la letteratura; ma può desso prendersi quale argomento per dimostrare che in tutti i casi in cui muffe vegetano a contatto di composti arsenicali fissi si svolgono gas arsenicali? — Può da esso inferirsi che altrettanto possa succedere quando le muffe vivono a contatto dei colori delle tappezzerie?

Ad ognuna di queste domande debbo rispondere di no. Le osservazioni fatte da Bischoff hanno un valore molto condizionato; ed a rigore egli non avrebbe dovuto neppur conchiudere che lo sviluppo del gas arsenicale fosse inerente all'attività biologica delle muffe, in quanto che egli non si trovava in presenza di una cul-

tura pura di questi germi. Tanto meno è permesso vedere in quel fatto un argomento per sostenere che le tappezzerie a colori arsenicali si rendano nocive per prodotti gassosi opera dell'attività biologica dei microorganismi: là si trattava infatti di acido arsenico, mentre che i colori utilizzati dall'arte tintoria sono sali generalmente a base di rame (verde Scheele - verde Schweinfurt) o solfuri d'arsenico (realgar-orpimento). Ed ognuno comprende come questa circostanza non sia indifferente: possono gli acidi arsenico ed arsenioso essere compatibili colla vita di alcuni germi; e può non esserlo il sale di rame; a tutta prima anzi non parrebbe, data l'azione antisettica riconosciuta nei composti di questo metallo. — Per concludere che le tappezzerie a colori di arsenico su cui vegetano microorganismi abbiano a rendersi velenifiche in ragione di composti gassosi, bisogna dunque dimostrare che questi microorganismi tollerano e trasformano precisamente quei colori che per le tappezzerie sono impiegati.

*

Tanto poi è vero che da siffatte osservazioni non è permesso trarre alcuna regola generale, che altri sperimentatori, malgrado le ricerche più accurate e non ostante che avessero cercate le condizioni più propizie affinché il fenomeno si avverasse, non poterono constatarlo. — Voglio alludere alle ricerche di Giglioli (16), di cui è fatto esteso resoconto negli annali della R. Scuola d'agricoltura di Portici. — Questo autore intraprese diverse ed ingegnose ricerche, servendosi come terreno di coltura di pane umido e di liquidi zuccherini. Da questi substrati ammassati spontaneamente in presenza di acido arsenioso aspirava l'aria, ed in essa cercava l'arsenico sia ossidando i supposti gas con AgNO_3 od AuCl_3 , sia riscaldandoli al rosso in una canna Marsh, allo scopo di ottenere depositi metallici.

La conclusione a cui venne dopo 8 mesi di esperienza è sostanzialmente contraria alla teoria di Selmi: in un solo caso ebbe a constatare una traccia di arsenico nell'aria estratta dall'ambiente in cui vivevano le muffe: ma non ne tiene gran conto tanto che finisce col dichiararsi partigiano dell'opinione già accennata di W. Forster.

Io non mi trattengo sulle condizioni che hanno sfavorito queste esperienze, ciò che risulterà dalla rassegna in cui dovrò passare le

mie: dico però fin d'ora che questo risultato negativo avuto da Giglioli era dovuto al non essersi egli quasi mai trovato in presenza di quei germi che sono atti a scomporre i preparati arsenicali, come anche a me in alcuni casi è successo.

*

Si può dire per tanto che circa l'azione dei microfiti sui composti arsenicali fissi non si possedevano fin'ora che nozioni generiche e molte vaghe; e pure ammesso come provato che in certe circostanze si possano svolgere gas venefici, restava a dimostrare quali germi fossero capaci di questa trasformazione e su quali composti potessero preferibilmente agire; ciò portava a spiegare perché vari ricercatori hanno contraddetto il fatto, non avendolo verificato: restava a dilucidare la natura chimica del gas che si produce e il meccanismo di sua produzione. Restava poi a studiare tutta la parte pratica, che realmente interessa l'igienista; se cioè date le condizioni in cui si trovano i preparati d'arsenico negli ambienti abitati (colori di tappeti, di carte d'apparato, di mobili, ecc.) si verifici ciò che si potè accertare nelle esperienze di laboratorio.

Non essendosi a questo riguardo fin'ora istituite ricerche su colture pure di microrganismi, nè era possibile pronunziarsi sulla natura dei germi che fossero atti a gassificare i composti fissi d'arsenico, nè eliminare il dubbio che si sia potuto trattare di fenomeni simbiotici.

*

PROGRAMMA DELLE
MIE RICERCHE.

Esposto così in breve lo stato attuale della scienza su questo argomento, passo alle mie esperienze.

Il piano delle mie ricerche si presenta schematicamente con questo indirizzo:

1.º Dimostrare se da terreni di cultura arsenicali esposti all'inquinazione spontanea di diversi ambienti si possano sviluppare composti gassosi d'arsenico.

2.º Nell'affermativa, isolare i germi che sono capaci di questa trasformazione e caratterizzarli.

3.º Ricercare per quali composti d'arsenico quest'attività degli arseniobatteri si presenta più spiccata; se essa è da estendersi

anche ai prodotti arsenicali utilizzati dalle arti e dalle industrie (colori) ed in ogni caso quali condizioni la facilitino; quali vi riescano di ostacolo.

4.° Studiare i composti volatili che si sviluppano, utilizzando culture pure in terreno arsenicale.

5.° Indagare il meccanismo con cui questi gas si producono sotto l'energia biologica dei microrganismi.

Questi diversi punti che mi paiono formare il nucleo di tutta la questione fino ad oggi discussa circa l'avvelenamento arsenicale degli ambienti, hanno avuto, come era a prevedersi, diverso esito: e mentre per alcuni fu possibile un'illustrazione completa, per altri fu soltanto permesso acquistare qualche dato positivo, qualche criterio generico (*).

I.

Per rispondere al primo quesito, la cui soluzione doveva aprirmi la strada per tutte le altre ricerche, io ho preparato alcune pappe di patate contenenti da 5 a 10 centigrammi di anidride arseniosa per 1000 di pappa: le distribuii in larghe capsule di vetro e le tenni esposte per qualche giorno all'aria libera di una cantina. La vegetazione delle muffe e dei batteri comuni dell'aria vi apparve in breve tempo rigogliosissima; ed in capo ad una settimana cominciò a svilupparsi un intenso odore di aglio, indizio di emanazioni arsenicali gassose.

Le culture furono allora poste in un'ampia camera di vetro; e quindi col mezzo di un aspiratore automatico determinai una corrente continua di aria, che per due settimane circa feci gorgogliare in una soluzione calda di nitrato d'argento.

La corrente d'aria arrivava dall'esterno saturata di vapor acqueo (cioè per mantenere un grado di umidità favorevole allo sviluppo dei germi), andava a lambire il fondo della camera di vetro, ne riusciva per un tubo posto alla sommità e, dopo essersi asciugata

DA TERRENI ARSENICALI AMMUFFITI SI POSSONO SVILUPPARE COMPOSTI VOLATILI DI ARSENICO.

(*) Le esperienze che si riferiscono a questo studio furono incominciate nel maggio 1891 e proseguite fino all'aprile 1892.

attraverso a pezzettini di cloruro di calcio e filtrata su parecchi batuffoli di cotone, passava nel soluto di nitrato d'argento.

Con questa efficace filtrazione v'era garanzia che nella soluzione argentea non poteva giungere arsenico se non in forma gassosa.

Al 3° giorno dacchè l'apparecchio funzionava si poteva già constatare una spiccata riduzione del sale d'argento: ma non credetti dover a ciò attribuire un'importanza decisiva, in quanto che è noto come dalle culture di microrganismi, e soprattutto dalle muffe si possano svolgere altri composti avidi di ossigeno; così i prodotti aldeidici (aldeide formica - ald. acetica), così l'alcool, che per un prolungato contatto coll' AgNO_3 poteva ossidarsi a spese di questo sale. Di più era anche ovvio pensare ad una precipitazione in nero per tracce di solfidrico o d'ammoniaca. Il giudizio decisivo doveva quindi rimettersi ad altra indagine chimica.

E di fatti nella soluzione di nitrato d'argento liberata dal metallo con HCl e concentrata, si poterono avere le reazioni caratteristiche dell'arsenico.

I risultati di questo primo esperimento rendevano adunque manifesto il fatto che composti gassosi dell'arsenico si erano sviluppati dalle culture dei saprofiti; di più, pur non volendo ritenere trattarsi di idrogeno arsenicale, era ad ogni modo evidente che il nitrato d'argento fissava in qualche modo il gas in questione.

*

A maggior conferma e per verificare se il fenomeno si manteneva costante, altre poltiglie arsenicali vennero inquinate con tracce delle prime culture....: le stesse emanazioni agliacee; analoga riduzione del nitrato d'argento, ecc.

Nell'intento di praticare anche un dosaggio rapido dell'arsenico, questa volta il saggio venne fatto all'apparecchio di Marsh sul liquido liberato dall'argento con ac. cloridrico e da HN O_3 colla evaporazione e con ripetuto trattamento all'acido solforoso. Ottenni un anello del peso di gr. 0.0028. Siccome il composto d'arsenico mescolato alle culture era anidride arsenica, si deve concludere che oltre 4 milligrammi avevano subito la trasformazione in gas; di fatti gr. 0.0028 di As. metallico vengono a corrispondere a gr. 0.0043 di As_2O_3 .

Tale effetto era stato ottenuto in 32 giorni da gr. 800 di poltiglia contenenti gr. 0.12 di anidride arsenica sciolta in acqua tartarica e distribuiti su una superficie totale di circa 45 centimetri quadrati. V'è poi ragione per credere che la quantità di arsenico gassificata fosse superiore a quella ottenuta al suddetto trattamento e risulterà il perchè allora quando tratterò della natura dei gas arsenicali che si svolgono in questa fermentazione.

Questi soli dati, mentre da una parte valevano a dimostrarmi l'efficace lavoro dei germi sui composti fissi di arsenico, dall'altra, attesa la loro evidenza, facevano domandare come mai sia potuto succedere che altri ricercatori abbiano conchiuso in senso opposto, e come mai possano ancora aver luogo dei dubbi a questo proposito. — La ragione di siffatte divergenze divenne palese allorché con nuovi esperimenti constatai che variando la qualità dei germi coltivati, il fenomeno della gassificazione dell'arsenico veniva sensibilmente a modificarsi, fino a scomparire, in certi casi, del tutto. Infatti accadde che diverse pappe arsenicali, dove pure germi di molte specie avevano trovato sviluppo ed in condizioni di calore, di umidità, di nutrizione presso a poco uguali alle altre, non dimostrarono di aver subito alcun cambiamento. Dall'aria di parecchie stanze s'erano raccolti germi, i quali non apparivano dotati della proprietà di scomporre i preparati d'arsenico.

Qui cominciai il lavoro di separazione dei germi e lo studio su colture pure, di cui tratterò in questo secondo capitolo.

II.

Per isolare i microrganismi che avevano preso sviluppo sulle prime poltiglie arsenicali esposte all'inquinamento spontaneo, ricorsi al solito mezzo delle colture a piatto; dovendo poi favorire lo sviluppo ai singoli germi in rapporto alle speciali esigenze che potessero avere, feci due serie di colture, impiegando rispettivamente gelatina acida e gelatina alcalina.

Dei germi isolati alcuni appartengono alle muffe, altri agli schizomiceti; fra le prime noto il *penicillium glaucum*, l'*aspergillus glaucus* ed il *mucor mucedo*. Quest'ultima muffa, malgrado che fosse comparsa con un certo ritardo, finì poi per invadere a poco

ISOLAMENTO DEI GERMI CHE GASSIFICANO LO ARSENICO.

a poco tutto il terreno di cultura. E si fu appunto durante questa sua rigogliosa vegetazione che diventò spiccato lo sviluppo dell'odore agliaceo sopra citato. Molti altri batteri a forma allungata e rotonda, fluidificanti e non fluidificanti si fecero notare; ed io mi sarei occupato a riconoscerne esattamente la specie, quando negli esperimenti collaterali, che descriverò fra breve, li avessi trovati capaci delle importanti trasformazioni a cui alludo; ma ciò non è successo.

Pertanto ognuno dei germi isolati e trasportati in cultura pura ed altri fra i saprofiti che soglionsi più comunemente tenere nei laboratori (b. radiceforme, b. prodigioso, b. sottile, sarcina gialla) fu coltivato separatamente in pappa arsenicale sterilizzata. — Anche per saggiare la tolleranza rispetto all'elemento attivo, questa volta ne aumentai sensibilmente la concentrazione, fino ad avere gr. 0.5 di acido arsenico per 1000 grammi di sostanza. — Le culture furono mantenute alla temperatura dell'ambiente (22-27° C.) ed alla luce diffusa. — Dopo un mese di prova, lungo il quale ciascun germe era cresciuto rigoglioso, specialmente le muffe, potei verificare che l'esalazione di odore agliaceo si era manifestata soltanto nelle culture del *mucor* e dell'*aspergillo*; con molto maggiore intensità nella prima. — Per questi fatti acquistava soprattutto importanza il *mucor mucedo*, muffa molto diffusa nei nostri ambienti e facile a svilupparsi anche nei più semplici substrati nutritivi.

*

ESPERIENZE SU CULTURE PURE DI MUCOR.

Per maggior conferma e anche per vedere se questo fenomeno rilevabile semplicemente coll'olfatto, poteva con fiducia ritenersi dimostrativo dello sviluppo di un gas arsenicale, institui nuove ricerche chimiche valendomi di culture pure di *mucor*.

La poltiglia di patate contenente anidride arsenica e addizionata di piccola quantità d'acido tartarico, che spiega favorevole influenza sullo sviluppo del fungo, venne distribuita in 10 grandi bottiglie di Erlenmeyer. Ognuna di esse venne poi chiusa con tappo di gomma a doppia tubulatura di vetro: uno dei tubi arrivava fino a sfiorare quasi la superficie da coltivarsi; l'altro penetrava appena nel collo della bottiglia; entrambi si incurvavano poi all'esterno per facilitare l'unione delle boccie in catena. Chiuse

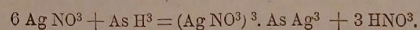
le estremità esterne dei due tubi con batuffoli di cotone, le boccie vennero sterilizzate nel vapore sotto pressione; essendosi il terreno mantenuto sterile per cinque giorni, procedetti a seminarvi il fungo, prendendo l'innesto da culture pure in agar. — Attesi qualche giorno fino ad aver ottenuto una vegetazione rigogliosa e poi servendomi di tubi di gomma sterilizzata riunii le dieci boccie in catena; un estremo di questa catena fu posta in relazione con boccia di lavaggio (acqua distillata), l'altro con una boccia Wulff contenente una soluzione di Ag NO_3 al 5 %. Questa ultima boccia era poi unita ad una pompa Bunsen. — La figura della tavola indica con dettagli la disposizione dell'apparecchio ed il modo di funzionare.

In questo modo anche con un prolungato soggiorno delle culture a temperatura relativamente elevata, quale è quella dei mesi di luglio ed agosto, veniva sempre a mantenersi un grado di umidità propizio per la vita del fungo; la sua esigenza rispetto all'ossigeno era poi soddisfatta dall'efficace ventilazione che la corrente aerea determinava nei matracci. Nè era da temersi il pericolo dell'introduzione di germi estranei, perchè l'aria si filtrava attraverso ai numerosi batuffoli di cotone conservati nelle tubulature. L'esperimento durò 28 giorni; alla fine di questi, giovandomi dello stesso metodo rigoroso sopra descritto, procedetti con ottimo risultato alla determinazione dell'arsenico nella soluzione argantica *filtrata*.

*

M'interessa tanto più di segnalare che la soluzione argantica prima di procedere al saggio analitico, venne filtrata, in quanto che aveva destato vivo interesse il fatto che oltre al precipitato nero di argento ridotto s'era deposta considerevole quantità di una sostanza gialla cristallina facile ad imbrunire per azione della luce. — A tutta prima speravo si dovesse qui trattare di un composto arsenicale; lo speravo perchè così si sarebbe reso molto più facile il caratterizzare il gas prodotto per l'attività fermentativa delle muffe.

D'altra parte si è recentemente notato (17) che in speciali condizioni si può produrre un composto giallo d'arsenico e nitrato di argento ($\text{Ag NO}_3^3, \text{As Ag}^3$) per l'azione di As H^3 sull' Ag NO_3 , in soluzione concentrata:



Di qui l'interesse della ricerca dell'arsenico. — Aggiungo però subito che le più scrupolose ricerche a questo riguardo riuscirono negative. La sostanza, cimentata anche in discreta quantità con i saggi più squisiti, compreso quello sensibilissimo dell'apparecchio di Marsh, non reagì. Io posseggo già alcuni dati relativi alla sua composizione; ma non è qui il caso di occuparmene, perchè divergei dal tema che mi sono proposto. — Formerà quindi oggetto di un'altra comunicazione.

*

L'attività del mucor sui composti arsenicali fissi, già messa in chiaro con queste prove, venne poi cimentata in diversa maniera variando il metodo di coltura, il terreno nutritivo, la qualità e la quantità dei composti d'arsenico. — Le culture furono fatte in brodo, agar, gelatina, pappe di pane, su fette di patate imbevute in una soluzione di acido arsenico.... — Quest'ultimo sistema è molto semplice ed utile.

Chi volesse rendersi conto dei fenomeni da me osservati, non ha che a tenere per qualche ora immersa in una soluzione di acido arsenico (3-4:1000) leggermente acidula per acido tartarico una fetta di patata o di carota, metterla poi in un tubo di vetro, sterilizzare e seminarvi il fungo: dopo tre o quattro giorni lo sviluppo del gas arsenicale è già manifesto, e ognuno può assicurarsene all'odore: il fenomeno una volta iniziato dura poi per lunghissimo tempo, se la vita della muffa non è compromessa per cattive condizioni di temperatura, di stato igrometrico, ecc.

Io conservo culture di otto mesi tuttavia odorose: e questa è la conferma sperimentale del fatto empiricamente rilevato che nelle camere a tappezzerie con verde Schweinfurth le esalazioni agliacee non cessano anche col volgere degli anni.

Ho poi avuto occasione di verificare che il mucor spiega una vera tendenza a raggiungere composti d'arsenico, semprechè non sieno in quantità superiori alla sua tolleranza: cosicchè è possibile la produzione dei gas anche quando il materiale contenente arsenico non sia direttamente unito al primitivo terreno di coltura. Seguendo il già citato metodo di coltura alla Roux, io coltivava la muffa in fette di patate libere d'arsenico: viceversa

MODO SEMPLICE PER
DIMOSTRARE L'AZIONE
DEL MUCOR SULL'AR-
SENICO.

questo era stato messo in debole soluzione al fondo del tubo strozzato contenente la patata; ne era imbevuto un batuffolo di cotone idrofilo, il quale veniva a distare circa 4 centimetri dal terreno coltivato. Coll'andar del tempo la muffa si vide propagarsi in basso, finchè ebbe luogo una vera invasione del micelio nel batuffolo imbevuto del liquido arsenicale; dopo un certo tempo non era più possibile discernere il cotone del tessuto vegetante. Questa osservazione ha pure la sua importanza pratica; di fatti supponendo (e fra breve passerò a dimostrarlo con un'altra serie di esperienze) che il mucor sia capace di scomporre i colori di arsenico delle tappezzerie, questa scomposizione è anche possibile quando il vegetale viva sulla faccia della tappezzeria che è rivolta contro il muro: i suoi ifi possono insinuarsi nei pori della carta e raggiungere in tal modo la superficie colorita. Questo deve anzi essere il caso più ovvio a succedere, per la facilità maggiore che hanno i germi di svilupparsi ove è presente un materiale nutrizio; qui il materiale nutrizio sarebbe rappresentato dalla colla, che si trova appunto sulla superficie opposta a quella dove sta il colore.

III.

Fino a questo punto gli esperimenti hanno avuto un indirizzo generico: essi sono stati rivolti a dimostrare se in massima da composti arsenicali fissi e precisamente dagli arseniati ed arseniti alcalini, dall'acido arsenico ed arsenioso le muffe erano capaci a mettere in libertà dei gas velenosi; abbiamo visto che non solo è possibile ma è facile; sicchè è acquisita in modo indiscutibile la nozione di un'importante proprietà che alcuni microrganismi hanno di rendersi indirettamente nocivi quando vegetano a contatto di certe sostanze contenenti arsenico. Però fin'ora le conclusioni non si dovevano trarre che in un campo molto ristretto: e avuto riguardo allo scopo che originariamente mi ero prefisso in queste ricerche, cioè di studiare se era da riferirsi a batteri il meccanismo con cui i colori arsenicali si rendono nocivi agli ambienti, mancava il controllo con quegli stessi colori che l'industria ha adottato nelle colorazioni degli arazzi e delle carte di lusso.

ESPERIENZE SUI CO-
LORI ARSENICALI DEL
COMMERCIO.

Ciò destava tanto maggior interesse, in quanto che a primo avviso parrebbe ovvio ammettere che non tutti i sali dell'acido arsenico ed arsenioso possano impunemente mettersi a contatto dei microrganismi. Avuto riguardo al fatto che dei sali d'arsenico i più impiegati nell'arte tintoria sono i verdi (verde Scheele, verde Schweinfurth) che sono a base di rame, non si poteva concludere sulla trasformazione dell'arsenito di rame in composti volatili, avendo praticato le prove sull'acido arsenico ed arsenioso e sui sali alcalini di questi acidi. Ho ripetuto adunque le esperienze in presenza dei colori più usati d'arsenico: verde Scheele, verde Schweinfurth, realgar, orpimento, ed ho data la preferenza ai colori preparati artificialmente, sia perchè incontrano maggior favore nell'industria, sia per avere la persuasione di agire su materiale più puro. Anche qui scelsi la poltiglia di patate come terreno di coltura; e vi incorporai le suddette sostanze coloranti. Le quantità di queste variavano da un minimo di gr. 0.01 ad un massimo di 1 grammo p. 1000: ciò anche allo scopo di verificare la tollerabilità per la materia colorante. Le colture fatte aerobiche in boccie di Erlenmeyer a largo fondo vennero coperte con cappuccio di gomma e lasciate alla temperatura di 20 a 27° ed alla luce diffusa. *I risultati si riferiscono ad un mese di osservazione, e furono:* sviluppo della muffa in tutte le colture, sviluppo con produzione di gas d'odore agliaceo solo nelle pappe contenenti colori verdi. Il solfuro d'arsenico, per lo meno lungo tutto il tempo in cui durò l'osservazione, non mostrò di essere trasformato.

*

Devo qui notare che dopo la ripetute e rigorose conferme a mezzo dell'indagine chimica della stretta relazione di causa ed effetto fra lo sviluppo del gas arsenicale e la produzione dell'odore agliaceo; *dopo la prova che dalle colture di mucor in patate non arsenicali nessun fenomeno si produce che possa minimamente mentire siffatto carattere*, io in tutte le esperienze successive ho ritenuto lecito di attenermi nell'interpretazione dei risultati a questo semplice saggio organolettico, senza ulteriore controllo della analisi chimica, per la quale sono necessarie lunghe manipolazioni della sostanza e disposizioni di apparecchi, in cui non sempre è facile

mantenere lo scrupolo riguardo alla purezza delle culture. Del resto non si tratta qui di interpretazioni dubbie, in cui possa essere messa in giuoco l'imperfezione dei sensi; ma si tratta di un'intensa esalazione, che lascia convinto chi la percepisce. Credo quindi giustificato il mio contegno nello stesso modo che quello del chimico, il quale a volte sa distinguere il solfidrico, l'acido solforoso, l'acido acetico, l'ammoniaca ecc. al semplice odore.

*

Le ricerche chimiche vennero di nuovo ripetute allora quando ebbi a sperimentare sulle tappezzerie. Feci costruire una grande cassa in legno e internamente la tappezzai di carta colorita con verde Schweinfurth sterilizzata; l'aderenza della carta alle pareti fu lassamente stabilita per mezzo di colla d'amido sterilizzata e poi inquinata con spore di mucor. In tale cassa ben suggellata con mastice in tutte le sue commessure praticai due fori: da uno di questi determinai a mezzo della pompa Bunsen una presa continua di aria che veniva a gorgogliare in una soluzione di nitrato d'argento. Affinchè poi la colla non si avesse ad essiccare, ciò che avrebbe compromesso lo sviluppo e la vita della muffa, usavo bagnare di quando in quando tutto l'assito con acqua distillata. Dopo 39 giorni d'esperimento, procedetti alla ricerca dell'arsenico coll'apparecchio di Marsh-Fresenius: il risultato fu anche questa volta positivo. Perciò anche se qualche dubbio fosse rimasto circa l'interpretazione ed il valore pratico da darsi alle esperienze finora citate, doveva a questo punto scomparire, in quanto che l'esperimento aveva riprodotto ciò che natura'mente può succedere.

ESPERIENZE SULLE
TAPPEZZERIE.

*

Questa speciale attività manifestata dal mucor mucedo quando vegeta a contatto di composti arsenicali fissi acquista dunque, per la sua costanza, il valore di una vera reazione chimico-biologica. *E mi riservo di mostrarne alcune importanti applicazioni pratiche.* Varia per altro la sensibilità, di questa reazione in rapporto con parecchie condizioni, fra cui le più importanti sono:

CONDIZIONI CHE FA-
VORISCONO AL MUCOR
LA GASSIFICAZIONE
DELL'ARSENICO.

1° *Umidità*: nè vi insisto oltre, perchè essa soddisfa ad una legge generale di vita dei microrganismi.

2° *Aria*: la presenza dell'ossigeno è indispensabile alla vita del mucor; nè può la muffa utilizzare l'ossigeno combinato; ciò avevo creduto da prima e aveva anzi supposto che potesse aumentarsi la scomposizione dell'acido arsenico con uno stato di anaerobiosi; dovetti però ben presto convincermi del contrario: *cessa la formazione del gas se l'aria viene a mancare*. Una prova dell'avidità del mucor per l'ossigeno l'ebbi ogni volta che ne misi le culture in corrente d'aria. Siccome il tubo afferente veniva a sfiorare la superficie coltivata (V. fig. della tavola) io osservai il micelio del fungo insinuarsi in tale tubo e costituirvi un vero zaffo capace col tempo di rallentare la corrente. Tale osservazione trova un giusto riscontro in altre già fatte, essendosi riconosciuto che alcune muffe crescono in direzione del vento.

Diminuendo invece l'accesso dell'aria, il mucor rallenta le sue fasi di vita, finchè questa riesce incompatibile nel vuoto.

Le esperienze a tale riguardo furono praticate col metodo di Buchner. Parecchi innesti in patate arsenicali vennero chiusi in un vaso contenente un bagno di pirogallato potassico: li lasciai per 24 ore a bassa temperatura, onde impedire l'accrescimento prima che tutto l'ossigeno fosse assorbito; e da ultimo li posi al termostato (27°-30°) ove rimasero per 25 giorni. Non si verificò alcuno sviluppo del fungo; invece il risultato fu positivo in tutti i controlli.

3° *Quantità e qualità dei composti d'arsenico presenti nelle culture.*

Veramente non si può dire che l'arsenico non sia un veleno per le muffe; sarebbe più esatto dire che la dose venefica è più elevata a paragone di altri microrganismi. In fatti coltivando il mucor in substrati diversamente ricchi d'arsenico, si trova un punto in cui la muffa stenta a crescere; così i terreni che ne contengono dal 4 al 5 ‰ sono già poco adatti al suo sviluppo. — Più spiccata per altro si dimostra la tolleranza per alte dosi, se il fungo fu prima abituato alle piccole o meglio ad un progressivo aumento. Sicchè anche per le muffe si verifica una specie di mitridatismo. In generale, per ottenere effetti intensi, mi sono giovato di culture in patate, contenenti da gr. 0.1 a gr. 0.5 di acido arsenico o di arseniati sodico o potassico p. 1000. — Varia anche l'intensità d'azione secondo che il substrato nutritivo è solido o liquido. — Nei liquidi

v' ha notevole ritardo; e ciò probabilmente sta in rapporto colla minore quantità di ossigeno disponibile.

Io osservai di fatti che nelle culture in brodo arsenicale, finchè la muffa manteneva il suo micelio negli strati profondi del liquido, non si riusciva a percepire lo sviluppo del gas agliaceo; venuto il micelio alla superficie, si iniziava tosto una rigogliosa vegetazione e con essa la scomposizione dell'ossido arsenicale. Dato per altro un terreno solido, è molto più facile venga trasformato il composto d'arsenico se lo si aggiunge sciolto, che non se lo si mescola solido.

*

È poi curioso il fatto che là dove il mucor mostrava già intolleranza, crescevano invece ancora rigogliose *altre muffe che non manifestano alcuna proprietà di scomporre l'arsenico*: ad esempio il *penicillium glaucum*. Questo fatto rende probabile ragione del perchè altri osservatori che sperimentarono con dosi elevate di composti arsenicali, non ebbero a notarne la scomposizione, malgrado che avessero ottenute vaste culture di muffe. Giglioli mescolava a pane ammuffito proporzioni piuttosto forti di acido arsenico; veramente egli non dice la dose precisa, ma la lascia intravedere allorchè parla delle esperienze in liquido zuccherino, a cui aveva aggiunto per 500 cmc. gr. 2,225 di $\text{As}^3 \text{O}^3$ sciolti in soda caustica.

Io constatai che tale dose è più tollerabile nella cultura del penicillo, che in quella del mucor: delle due muffe piglia senza dubbio il sopravvento la prima. Se ciò è risultato a me che pure *sperimentavo su culture pure*, a maggior ragione è da aspettarsi allorchè dei germi viene a mettersi in giuoco la concorrenza vitale. Tuttavia i già citati esempi di adattamento che la muffa dimostra verso dosi via via più forti del veleno, fanno ritenere che si possa (soprattutto coll'artificio) per lo meno fino a un certo punto modificare tale incompatibilità.

Riguardo alla qualità dei composti d'arsenico, devo dire che il fenomeno della produzione del gas fu reso più facile ogni volta che impiegai acido arsenico, arseniati od arseniti alcalini; meno pronto ed intenso, ma sempre manifesto, lo ebbi dall'impiego dei sali di rame. — Già dissi del risultato negativo avuto per l'impiego del realgar e dell'orpimento. — Ad ogni modo qui devo aggiungere

che se il periodo d'osservazione delle culture si protrae per molti mesi, è possibile avvertire l'odore agliaceo anche dalle culture contenenti questi sali. — Viene però molto ovvio il sospetto che il materiale primitivo, in un così lungo soggiorno a contatto di sì energici trasformatori della materia, abbia dovuto subire qualche decomposizione: sicché era giustificata la conclusione a cui ero venuto nella mia nota riassuntiva (settembre 1891) che l'arsenico *allo stato di solfuro* non è dal mucor decomposto.

*

ALTRE MUFFE CHE
TRASFORMANO I COM-
POSTI FISSI DI ARSE-
NICO.

Lo studio fin'ora passato in rassegna pel mucor mucedo fu anche ripetuto per altre muffe che potei isolare dall'aria di diversi ambienti o che direttamente mi procurai in culture pure. Di tutte praticai innesti su patate imbevute d'una soluzione d'acido arsenico al 2 ‰. — Per non mettere poi in giuoco la sensibilità a me non ancora nota dei diversi organismi di fronte al veleno, ne diminuì la quantità con altre culture in patate immerse in soluzioni all'1 ed al 0,1 ‰.

Effetti poco apprezzabili e molto tardi a comparire ho così potuto ottenere da altre tre muffe: *sterigmatocisti ocracea*, *cefaloleicum rosaceum* e *mucor ramosus*. Quest'ultima muffa fornì l'esempio più bello dell'adattamento all'azione dei composti d'arsenico: infatti i primi trasporti in patate arsenicali furono seguiti da scarso sviluppo, ciò che dimostrava l'intolleranza del fungo pel nuovo elemento. Abituato con parecchi innesti alla presenza del veleno, potei ottenere delle splendide culture, in cui si sarebbe detto che l'arsenico favoriva lo sviluppo, mentre prima l'ostacolava.

MUFFA TROVATA LA
PIÙ ATTIVA FRA QUEL-
LE ESAMINATE.

Ultimamente da un pezzo di carota abbandonata all'aria libera ho potuto isolare una nuova muffa, la quale ha sui composti di arsenico un'azione molto più intensa, molto più pronta e sensibile di tutte quelle fin'ora studiate. — Dalle esperienze fatte in diversi substrati nutritivi e con quantità anche minime di arsenico si vede che quel germe può per l'arsenico essere considerato come un reattivo dei più squisiti: con culture in latte sono arrivato a svelare gr. 0.00002 di arsenito di sodio; ed evidentemente si trattava di una cifra ancor troppo alta.

Nè mi sono limitato a prendere come indizio della scomposizione l'odore ributtante di aglio, il quale è già per sè un criterio impor-

tante ed indiscutibile; ma ho trovato mezzi semplici per potere con reazioni chimiche svelare l'arsenico dopo che l'ha muffa la trasformato in composto gassoso. — Per esempio, il gas che si sviluppa, ossidato con soluzione acida di permanganato potassico, fornì un materiale molto opportuno per procedere al saggio di Marsh. — Questi fatti mi portano a credere che l'azione di questo microfito possa utilizzarsi con vantaggio nella determinazione dell'arsenico a scopo igienico, medico-legale, ecc.; e precisamente in quei casi dove gli attuali processi chimici trovano difficoltà, come allorchè si tratta di dimostrare tracce di arsenico in presenza di molta materia organica. — Io ho in questo senso praticate numerose esperienze, di cui rendo conto in una memoria a parte: *Sul riconoscimento dell'arsenico per mezzo delle muffe a scopo igienico e medico-legale*.

Naturalmente è da supporre che anche altri microorganismi, altre muffe posseggano siffatta proprietà, la quale deve essere inerente a qualche fattore biologico non comune a tutte (*). E sarebbe utile, avendo una vasta raccolta di questi saprofiti, proseguire le ricerche in questo indirizzo; se anche i risultati non possono avere

(*) Devo a questo proposito fare una breve digressione per rispondere ad una nota di A. De Gasparis (*Rivista Internaz. d'igiene*. - Napoli, gennaio 1892. - N. 1, pag. 49).

In quella nota, riferendosi al mio studio riassunto in una prima e breve comunicazione (settembre 1891), l' A. osserva che le muffe da me trovate capaci di scomporre i preparati d'arsenico non vegetano sulle carte d'apparato; vegetano invece molte altre (e ne fa i nomi, che toglie dai noti volumi del Saccardo, *Synloge fungorum*, 1891).

Certamente se avessi potuto disporre di queste muffe o se avessi avuto un facile controllo per caratterizzarle ed ottenerle in colture pure, non avrei trascurato di ripetere per esse i saggi praticati per le altre. — In mancanza di tanto materiale e di questi dati, credetti opportuno provvedere ad una scelta naturale: abbandonai perciò i terreni di coltura contenenti arsenico all'inquinazione spontanea di diversi ambienti ed isolai i diversi germi che vi prospero.

Ora fra le muffe ottenute da me in coltura pura ve ne fu alcuna di quella citata dal De Gasparis come inquinante delle tappezzerie? — Io non lo so, nè mi curai di saperlo; avendo cogli esperimenti successivi riconosciuto che la produzione del gas arsenicale erasi resa manifesta solo nelle colture di *Mucor mucedo* e di *Aspergillus glaucus* (altri germi a quel tempo non erano stati ancora sperimentati), era giusto trascurare tutte le altre per cui il reperto risultava negativo.

un valore pratico essendo oramai note le specie che hanno maggiore probabilità di svilupparsi negli ambienti ordinarii, ne hanno certo uno scientifico, perocchè portano un contributo interessante di criterii per la diagnosi differenziale delle muffe; criterii che possono valere in certi casi anche per la distinzione di individuo da individuo, in quanto che vedemmo non trattarsi di un carattere esclusivo di specie o di famiglia. — In un caso, ad esempio, mi occorre di isolare da una patata due colonie di muffe dotate di analoga facoltà cromogena e che si potevano anche confondere per caratteri macroscopici: il notare però che una (*aspergillus glaucus*) scomponeva l'acido arsenico e l'altra no, ha portato subito ad una distinzione netta fra le due muffe.

Devo qui a scanso di equivoci, fare una considerazione riguardo al significato da darsi alle parole: « scomposizione dei composti arsenicali fissi ». Io intendo parlare di scomposizione *intensa, pronta e duratura*; insomma di un fenomeno che si mette in giuoco con una certa sollecitudine, nè cessa per volgere di mesi. Che se volessi intendere la cosa in significato troppo assoluto e generale, non si potrebbe sapere a quali microrganismi non si possa dare il nome di arsenio-batterii: da ogni fenomeno putrefattivo, che si verifichi in presenza di composti d'arsenico, è probabile (così almeno lasciano credere le esperienze di Hamberg) si svolgano tracce di gas ar-

Ma l'A. dice che le muffe da me caratterizzate non vegetano sulle tappezzerie..... Veramente, per essere giusti mi pare si debba aggiungere: « se non vi trovano condizioni opportune ». — Una volta dimostrato che le spore di certi germi esistono in copia nell'aria degli ambienti, perchè escludere ogni caso di sviluppo su un substrato che vi persiste in contatto?

Del resto per scomporre i colori, non è poi indispensabile che le muffe vivano proprio sulla carta; basta vivano nella colla, che s'impiega per far aderire le carte stesse. Organismi tanto poco esigenti in fatto di materiale nutrimento benissimo nell'ovatta umida, ed ogni cultore di batteriologia pur troppo ne vede e ne teme gli effetti, è permesso credere che si adattino con facilità a simili substrati organici. Naturalmente anche qui si esigono condizioni opportune pel loro sviluppo (un certo grado di umidità, la presenza di ossigeno ecc.). Ma queste condizioni non sono così difficili ad avverarsi per le abitazioni; infatti ogni igienista se ne occupa di proposito e tutto di mira a garantirsi con provvedimenti d'ingegneria sanitaria.

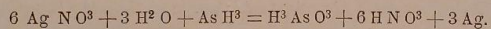
Infine premeva a me di stabilire anzitutto una legge generica, di cui la questione delle tappezzerie ed ogni altra analoga non è che un'applicazione pratica. A quali germi, oltre a quelli da me descritti, debba la legge estendersi e in quali casi essa soffra eccezione sarà facile in seguito stabilire. Ed io sarei lieto se mi si presentasse l'occasione di praticare i saggi anche per le muffe che il De Gasparis mi suggerisce.

senicali; manca poi a me il controllo per giudicare se con una prolungata vegetazione di molti mesi e di anni possano anche le muffe non dotate della suddescritta facoltà produrre qualche traccia di composti volatili dell'arsenico. Ma è evidente che un potere così limitato debba avere minima importanza tossicologica e quindi igienica. Con questa dichiarazione viene ad essere meglio definito il concetto che mi ha guidato in questo studio: a noi qui interessano quei germi che manifestano un'azione energica: da essi viene il pericolo; per gli altri l'interesse si riduce ad una pura curiosità scientifica.

IV.

Ed ora passo alle ricerche chimiche sul gas che si sviluppa nelle culture delle arsenio-muffe. Il concetto primitivo che mi aveva guidato e che mi aveva anche suggerito le disposizioni d'apparecchi sopra descritte fu che il meccanismo esercitato dalle muffe che scompongono l'acido arsenico ed arsenioso fosse essenzialmente un meccanismo di riduzione e di idrogenazione. Questa fu l'idea di quasi tutti gli autori che si occuparono di tale argomento; e in base ad essa, nel verificare su culture di singoli microorganismi ciò che era stato fin'ora asserito dei microorganismi in genere, seguii il metodo comune di ricerca, come è descritto alla pag. 14, vale a dire il metodo fondato sulla riduzione del nitrato d'argento per l'idrogeno arsenicale, giusta l'equazione:

RICERCHE CHIMICHE.



Avendo poi realmente notato una riduzione del sale, e riscontrato arsenico nel liquido, dovevo (dato lo stato attuale della scienza) concludere che dalle culture di *mucor mucedo* a contatto con composti arsenicali fissi si sviluppa As H_3 : ciò feci nella mia nota riassuntiva del settembre 1891; nè ho ancora alcuna valida ragione di escludere.

Senonchè i dubbi cominciarono a sorgere allorquando, nei tentativi diretti a precipitare l'arsenito d'argento dalla soluzione stessa per l'aggiunta di N H_3 diluitissima, io verificai che non appena eccedevo nell'aggiunta dell'alcali, tosto si metteva in libertà una

sostanza volatile di odore agliaceo intenso; da ciò era ovvio arguire che un altro gas oltre l'As H³ si sviluppasse dalle suddette culture. E siccome esso poteva mettersi in libertà dalla soluzione argentica coll'aggiunta di qualunque alcali (potassa-soda-barite) pareva giusto supporre che il composto fosse di natura basica; che fosse possibile salificarlo con un acido, o almeno formarne un composto doppio coi sali di platino e d'oro.

Riguardo al primo punto, si rendeva subito necessaria una prima ricerca: stabilire se si fosse in presenza di un composto del carbonio: ciò per escludere maggiormente il dubbio che si potesse trattare d'una speciale combinazione dell'As coll'H, fra le tante supposte e non ancora ben definite.

Procedetti pertanto ad una combustione modificando all'uopo l'apparecchio consigliato da Fresenius (18) per la determinazione di gas idrocarbonati in genere.

Da un pallone contenente la soluzione argentica filtrata feci sviluppare il composto gassoso coll'aggiunta di potassa caustica; e spoglio d'ogni traccia di CO² per passaggio ripetuto attraverso ad ossido di calcio e potassa solida, lo mandai sull'ossido di rame rovente. I prodotti della combustione venivano poi ad agire su una soluzione limpidissima di barite. — Non tardò a prodursi in quest'ultima un marcato intorbidamento, che fu verificato di BaCO³. — Avendo l'apparecchio agito prima per lungo tempo di controllo, era escluso il dubbio che il fattore dell'intorbidamento fosse estraneo alla combustione del gas passato sull'ossido di rame.

Resta però un'importante obiezione: « lo sviluppo di CO² dimostra che il gas è idrocarbonato; ma non dimostra che è arsenicale; » e qui non posso rispondere se non con ragioni di probabilità; mi pare infatti molto difficile che nelle condizioni delle mie esperienze abbia potuto fissarsi un altro gas che possa mettersi in libertà con un trattamento potassico: fu dimostrato che da certe piante inferiori possono svilupparsi idrocarburi (metano, etano...) ma si tratta di gas inerti, che a contatto di AgNO³ tutt'al più possono ossidarsi, non già dare composti, atti a riprodurre il gas primitivo per l'azione di una base.

Un gas arsenicale bruciò poi senza fallo sull'ossido di rame perchè vi riscontrai il prodotto finale della combustione: l'anidride arsenica. Evidentemente questa doveva essersi raccolta nelle parti

più fredde del tubo od anche poteva aver formato combinazione coll'ossido rameico. Per separarla, tutto l'ossido di rame impiegato nel trattamento venne messo a bagno caldo in soluzione diluita di potassa caustica. Dopo due giorni filtrai e lavai a lungo; concentrarai tutti i liquidi di lavaggio e precipitai alla corrente solfidrica la piccola quantità di rame rimasta sciolta. Il liquido filtrato doveva contenere l'arsenico sotto forma di solfoarseniato. Diffatti coll'aggiunta di HCl in eccesso si ebbe precipitato giallo, che ossidato con HN O_3 reagì manifestamente all'apparecchio di Marsh (*).

Questi risultati facevano sempre più sperare nella possibilità di salficare il composto soprattutto coll'impiego dei reattivi propri delle basi organiche; e d'altra parte il separare il composto stesso che poteva credersi formato coll'argento (qualunque esso fosse) attese le molteplici impurità che la soluzione doveva senza dubbio contenere come prodotto della fermentazione del mucor, mi pareva malagevole.

Spostato pertanto il gas con soluzione diluita di potassa caustica, lo feci gorgogliare in corrente d'aria attraverso ad una soluzione alcoolico-cloridrica di cloruro platinico. La corrente passò lenta per due giorni interi: ma dal liquido evaporato potei ottenere solo pochissimi cristallini, sui quali, non che tentare un dosaggio di platino e d'arsenico, cadeva anche dubbio in riguardo alla purezza: anzi con tutta probabilità aveva reagito sul cloruro platinico anche qualche traccia di ammoniacale, o d'ammoniacale composte.

L'esperienza fu ripetuta facendo per 10 giorni attraversare la soluzione cloro-platinica dalla stessa aria estratta dalle boccie in cui vegetavano i mucor. Ma i risultati non furono più soddisfacenti.

Frattanto prima di ascrivere l'insuccesso alla cattiva scelta del metodo, bisognava ripetere le esperienze con quantità forti della sostanza, variando anche le condizioni, la concentrazione, la qualità dei reattivi ecc., ma la stagione fredda sopravvenuta mal si prestava per una coltura in esteso di mucor quale mi sarebbe occorsa per produrre fenomeni intensi. Perciò, pure riconoscendo l'importanza di questa determinazione, devo rimandarla al giorno in cui potrò disporre di un copioso materiale di ricerca.

(*) Trovo utile notare per incidenza che anche l'ossido di rame fornito dalle migliori fabbriche o che comunemente s'impiega nell'analisi elementare organica è impuro per arsenico. Solo con un lavaggio prolungatissimo alla potassa in soluzione bollente potei garantirmi dell'autenticità delle reazioni che dovetti praticare.

Fin'ora le esperienze in complesso non lascierebbero a rigore decidere se al composto organometallico volatile vada unita anche la produzione di As H^3 . Io ad ogni modo l'ammisi per la riduzione relativamente precoce del nitrato d'argento. Ancorchè vi sieno prodotti della fermentazione delle muffe, che hanno comportamenti analoghi, nelle condizioni in cui fu condotta l'esperienza (Ag NO_3 non era in soluzione ammoniacale) essi avrebbero richiesto un contatto molto più lungo coll'ossidante.

Certo si è per altro che l' As H^3 non deve svilupparsi che in tracce. — Io non trascurai di ricercare l'arsenico nella soluzione argentea, dopo trattamento con KOH ; anche ai saggi più sensibili (apparecchio di Marsh) non potei ottenere che reazioni molto deboli.

Le ricerche chimiche di cui fin'ora ho discorso si riferiscono tutte al gas svolto dalle culture di *Mucor mucedo*, che nell'ordine cronologico delle mie ricerche fu la prima muffa (benchè non la più attiva) trovata capace di gassificare l'arsenico dai composti fissi. Per le altre due arseniomuffe semplificai di molto il saggio diretto a rivelare l'arsenico, utilizzando le energiche proprietà ossidanti del permanganato di potassio.

V.

AZIONE ESERCITATA
DALLE MUFFE NELLA
GASSIFICAZIONE DELL'
ARSENICO.

Strettamente collegato coll'argomento della natura chimica del gas che si svolge dalla vegetazione di *M. mucedo* in patate arsenicali è l'altro del vero meccanismo d'azione che abbia ad esercitarsi.

Dagli autori, che s'occuparono in modo generico di questo argomento, esso fu quasi sempre interpretato come un fenomeno di riduzione. Senonchè bisogna subito distinguere la riduzione semplice, che consiste in una semplice eliminazione di ossigeno dalla molecola dei composti (*l'alcool disossida il bicromato di potassio trasformandolo in sale di cromo; l'aldeide disossida il nitrato di argento riducendolo in argento metallico*), da una riduzione a cui tenga dietro un'idrogenazione (*l'idrogeno nascente riduce l'acido arsenico, e poi si combina direttamente al metalloide per formare As H^3*). Il primo esempio di riduzione può succedere anche solo pel meccanismo respiratorio delle cellule; ognuno però comprende come qui non si possa spingere il fenomeno più in là dell'ottenere

arsenico metallico, allo stesso modo che dalla riduzione dei nitrati e dei nitriti operata da molti germi si elimina azoto e non ammoniaca (19). E ad ogni modo non è questo l'esempio che faccia pel caso nostro, perchè il fenomeno della scomposizione, invece di accrescersi negli ambienti poveri d'ossigeno atmosferico (brodi arsenicali), diminuisce, fino a scomparire del tutto quando l'aria è assente.

Per ottenere d'altra parte idrogeno arseniato è indispensabile una speciale azione che fissi H sull'As; e qui viene in campo la famosa questione dello svolgimento di idrogeno nascente per la vita degli organismi inferiori. Ammessa da Pollacci, da Selmi e con maggior rigore dalle più recenti esperienze di Fitz (20) e di Mayer (21), quest'attività dei germi (o, per meglio dire, di alcuni germi) ha servito al Nencki (22) di base per una vera dottrina sulla putrefazione degli albuminoidi: i batteri, secondo questo autore, decomporrebbero l'acqua in H e nel gruppo ossidrilico OH, dando così origine ad una doppia serie di fenomeni: di *riduzione* e di *idratazione* od *ossidazione*.

In questa maniera sarebbe facile rendersi ragione dello sviluppo di idrogeno arsenicale: verrebbe a compiersi per meccanismo biologico ciò che avviene nell'apparechio di Marsh per fenomeno chimico. Questa produzione di idrogeno nascente è però finora confermata solo per pochi batteri: per le muffe ad esempio esistono le esperienze di Missaghi (23) contraddittorie. E nel nostro caso deve essere scarsa in rapporto colla piccola quantità di As H³ che si può sviluppare.

Interessa pertanto molto più lo studio di altri fenomeni biologici, a cui è dovuto lo sviluppo dell'altro gas sopra menzionato. E qui è da presumersi che entri in giuoco una speciale attività fissatrice di certi prodotti del ricambio organico, i quali allo stato nascente avrebbero tendenza a formare coll'arsenico composti volatili. Si potrebbe forse trattare di combinazioni alcooliche o aldeidiche; né mancano criteri per attenersi a simile interpretazione.

Gli innesti delle arsenio muffe in substrati nutritivi di varia costituzione chimica non sono seguiti tutti da uno sviluppo di gas agliaceo ugualmente intenso, ugualmente pronto e duraturo. — In un terreno costituito da soli albuminoidi, il fenomeno o non si avvera o è scarsissimo ed effimero. Raggiunge invece il massimo grado quando sono presenti discrete quantità di zucchero, di amido,

idrati di carbonio in genere. Gli è per questo che le culture in patate ed in carote sono le più propizie per la scomposizione dei composti fissi d'arsenico. Le culture di *mucor mucedo* in albume d'uovo semplice, benchè seguite da discreto sviluppo, non s'acconciarono che ad una esalazione agliacea molto passeggera, che cedette ben presto all'altra propria dei processi putrefattivi: quelle in albume addizionato di glucosio la diedero per contro intensissima. — Se si pensa che alcune muffe sono dotate di una particolare facoltà idratante ed ossidante verso gli idrati di carbonio, è facile comprendere come i prodotti d'ossidazione di questi materiali (alcoli-aldeidi) allo stato nascente possano associarsi agli ossidi dell'arsenico per formare speciali composti organometallici. Ripeto peraltro che un giudizio certo non sarà possibile se non dopo una analisi elementare di questi composti, illuminata anche da uno studio dei prodotti di ricambio delle arsenio muffe.

CONCLUSIONI.

Riassumo ora il risultato delle mie esperienze con queste conclusioni:

— È confermato in modo indiscutibile che per la vegetazione di muffe a contatto di composti arsenicali fissi possono svilupparsi gas arsenicali.

— Non tutte le muffe, ma solo alcune godono di questa proprietà; sicchè si può immaginare una classe speciale di questi microrganismi, a cui dare il nome di arsenio-muffe.

— Le muffe da me caratterizzate come capaci di un' energica azione a tale riguardo sono tre, fra cui il *Mucor mucedo*; e l'*Aspergillus glaucus*.

— Lo sviluppare gas arsenicali da composti fissi d'arsenico non è una conseguenza necessaria del fatto che un germe vegeta bene in presenza di questi composti: possono molti germi vivere una vita anche rigogliosa, senza produrre la scomposizione.

— Le stesse arsenio-muffe possono crescere bene a contatto di composti arsenicali, senza trasformarli attivamente; e il fatto tiene alla qualità del sale d'arsenico. Riferendomi al *mucor mucedo* da me sperimentato, l'azione venne ad essere dubbia pei solfuri d'arsenico; e ciò è in relazione probabile coll'insolubilità del materiale. — Tuttavia va fatta una riserva a questa legge nel senso

che col prolungato soggiorno in coltura i suddetti composti possono per forze indirette anche inerenti alla vita della muffa stessa subire qualche modificazione nella loro struttura chimica e diventare atti alla trasformazione.

— Le condizioni che favoriscono la produzione del gas arsenicale alle arsenio-muffe, si possono così raggruppare:

1.° Quelle che favoriscono in generale la vita del fungo (abbondanza d'ossigeno, umidità, materiale nutrizio, dose sopportabile di composti d'arsenico);

2.° Quelle che dipendono dalla facilità di trasformazione dei composti: l'acido arsenico, gli arseniati ed arseniti di sodio e di potassio sono più agevolmente trasformati che l'arsenito di rame;

3.° Presenza di idrati di carbonio (amido-glucosio).

— Riferendomi alle esperienze sul *mucor mucedo*, le arsenio-muffe, possono scomporre l'arsenito di rame delle tappezzerie anche quando vegetano sulla colla impiegata per far aderire la carta al muro.

— Nella fermentazione delle arsenio-muffe in presenza di composti fissi di arsenico (mi riferisco alle esperienze fatte col *mucor mucedo*), può svolgersi idrogeno arsenicale; ma si tratta di minime quantità rispetto a un altro composto molto più importante, che è probabile risulti dall'associazione del metalloide a radicali organici alcoolici od aldeidici.

— Non esclusa l'azione riduttiva ed idrogenante su tracce dei composti arsenicali fissi, è probabile che per la massima parte la loro gassificazione sia intimamente connessa collo sviluppo di speciali sostanze chimiche (opera dell'attività biologica) associabili al metalloide e non comuni a tutte le muffe.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) F. R. OESTERLEN - *Handbuch der Hygiene*, pag. 526.
- (2) PUTZÉVS - *L'Hygiène dans la construction des abitations privées*, pag. 74.
- (3) *The med. Press. - and Circular*, 1^a serie 1875.
- (4) *Revue sanitaire de Bordeaux*, 25 aout 1883, pag. 137.
- (5) J. ROSENTHAL - *Traité d'hygiène publique*, pag. 439, ediz. franc.
- (6) *Annales d'hygiène publique et de médecine légale*, 2^a serie, t. XLII, pag. 166.
- (7) NEMMEL - *La tintura delle fibre tessili*. Trad. it. di R. LEPETIT, pag. 229
- (8) *Archiv. für Pharmakie*, 1883, pag. 271.
- (9) *A Treatise on Chemistry*, vol. I, pag. 520, e *Berichte der deutschen chem. Gesellschaft*, VII, pag. 1642.
- (10) WILLIAM FORSTER - *Experiments on the contamination of atmospheric air with the vapours arising from arsenical pigments*. *Chemical News*, 1880.
- (11) *Archiv. für exper. Pathol. u. Pharmak.* II, pag. 503.
- (12) *Archiv für exper. Pathol. u. Pharmak.* XI, pag. 200, e XIV, pag. 345.
- (13) *Zeits. f. analyt. chem.*, 1887, pag. 758.
- (14) *Zeits. f. Biologie*, t. VIII, pag. 444.
- (15) *Vierteljahrschr. für gerichtl. med.*, t. XXXVI, pag. 163.
- (16) I. GIGLIOLI - *Sullo svolgimento dell'idrogeno arseniato dalle muffe cresciute in presenza di sostanze arsenicali* « *Annuario della R. Scuola Sup. d'agricoltura di Portici* », Vol. II, 1880, pag. 165.
- (17) POLECK et TRÜMMEL - *D. Chem. G.*, 16 - 2435.
- (18) R. FRESENIUS - *Traité d'analyse chimique*, pag. 762 dell'ediz. francese.
- (19) LEONI - *Gazzetta chimica italiana*, Vol. XX, 1890, pag. 98.
- (20) *Berichte der deutsch. chem. Gesellsch.*, 11, 1880, e 12, 474, e *Biedermann's Centralblatt*, Juni, 1879.
- (21) *Lehrbuch der Gährungs-Chemie*, 3, pag. 207.
- (22) *Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch.* 12, 474.
- (23) *Gazzetta chimica italiana*. Anno V, 1875, pag. 419.

APPENDICE.

Aggiunta a pagina 22, linea 16, dopo le parole *al 0,1 o/oo*:

Risultò atto ad una trasformazione pronta ed evidente anche un aspergillo che risponde ai caratteri dell'*Aspergillus citreus* (Link-Saccardo - *Sylloge fungorum*, IV, pag. 65).

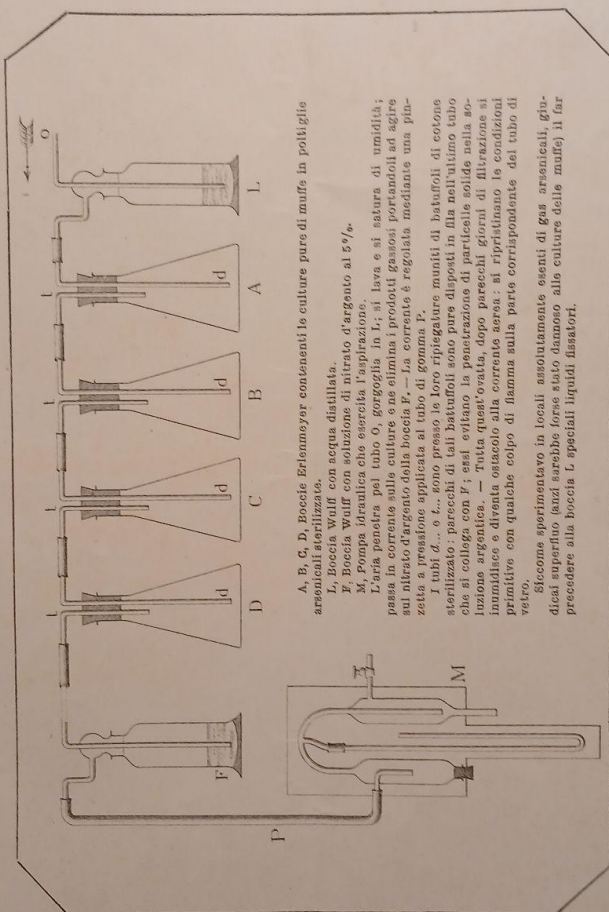
Aggiunta a pagina 22, linea 29, dopo le parole *fin'ora studiate*:

La muffa riconosciuta più attiva è un penicillo. Risultandomi ai caratteri microscopici dissimile dai comuni penicilli, mi rivolsi per una determinazione alla cortesia del prof. Saccardo, il quale è notoriamente principe dei micetologi. Egli ravvisò in questa muffa una mucedinea da lui scoperta sulla carta putrida e battezzata col nome di *penicillium brevicaulis*. (*Sylloge fung.*, Vol. IV, pag. 84.)

Ringrazio l'illustre scienziato di avermi reso noto questo interessante particolare circa il substrato organico in cui la muffa prende sviluppo. La coincidenza di questo fatto con l'altro che detta muffa mi risulta attivissima nella gassificazione dell'arsenico viene a confermare pienamente la teoria che io sostengo in questo studio sull'avvelenamento causato dalle tappezzerie arsenicali.

A pagina 30, linea 24, la terza conclusione, in base alle aggiunte surriportate, si legga come appresso:

— Le muffe fin'ora caratterizzate come capaci di un'energica azione a tale riguardo sono quattro: il *Mucor mucedo*, l'*Aspergillus glaucus*, l'*Aspergillus citreus* e il *Penicillium brevicaulis* (la più importante).



B. 60SIO. - Azione di alcune mufte sui composti fissi d'arsenico.

A, B, C, D, Boccie Erlennmeyer contenenti le culture pure di muffe in bottiglie
areolate, contenenti acqua distillata.

P, Boccia Wulff con soluzione di nitrato d'argento al 5%.

M, Pompa idraulica che esercita l'aspirazione.

L'aria penetra pel tubo O, gorgoglia in L; si lava e si satura di umidità;
passa in corrente sulle culture e ne elimina i prodotti gassosi portandoli ad agire
sul nitrato d'argento della boccia P. — La corrente è regolata mediante una pin-
zetta a pressione applicata al tubo di gomma P.

I tubi d... o L... sono presso le loro ripiegature muniti di battenti di cotone
sterilizzati: parecchi di tali battenti sono pure disposti in fila nell'ultimo tubo
che si collega con P; essi evitano la penetrazione di particelle solide nella so-
luzione argentea. — Tutta quest'ovatta, dopo parecchi giorni di filtrazione si
inacidisce e diventa ostacolo alla corrente aerea: si ripristinano le condizioni
primitive con qualche colpo di fiamma sulla parte corrispondente del tubo di
vetro.

Si come sperimentare in locali assolutamente esenti di gas arsenicali, glu-
dicci ed effluvia, si farebbe forse un fumoso alle culture delle muffe) il far
precedere alla boccia o speciali liquidi basanti.

