

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCXCIII.

1896

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME V.

2° SEMESTRE



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1896

1^a Per idrogenazione completa, ed allora si scinde in due molecole di metilammina ed una d'anilina.

2^a Per idrogenazione parziale ed azione dell'alcoolato sodico, in due molecole di cianuro sodico od i suoi prodotti di successiva trasformazione, ed in una molecola d'anilina. Siccome la quantità di ammoniaca, molto superiore a quella della metilammina, non si può attribuire che in piccola parte alla produzione delle materie catramose, si deve ritenere che la seconda reazione sia la predominante, anche per il fatto, che mentre negli apparecchi di assorbimento si arrestano quasi parti uguali di ammoniaca e metilammina, nelle basi trascinate dal vapor d'alcool e poi d'acqua sono invece costituite essenzialmente di ammoniaca con piccole quantità di metilammina, come se l'ammoniaca si fosse generata per una reazione secondaria succeduta a quella idrogenante del sodio.

La sostanza, che abbiamo qualche ragione per ritenerla una fenilpirrodiazolina, bolle ad una temperatura più alta del fenilpirrodiazolo, il che sarebbe in armonia con le pirrazoline, che generalmente hanno un punto d'ebollizione superiore ai corrispondenti pirrazoli.

Uno di noi (Andreocci) intende riservarsi lo studio dell'idrogenazione nella classe del pirrodiazolo(2.4) con vari riducenti, nell'intento d'isolare e studiare qualche rappresentante delle serie azoliniche, e di avere un certo numero di fatti onde confrontare il comportamento dell'anello pirrodiazolico con quello del pirrazolo, che fu pregevolmente illustrato dal prof. Balbiano nella sua Memoria: *Sulle relazioni fra pirrazolo, pirrolo e piridina*, pubblicata negli Atti della R. Accademia dei Lincei.

Chimica agraria. — *Sulla denitrificazione* (1). Nota di G. AMPOLA ed E. GARINO, presentata dal Socio S. CANNIZZARO.

La profonda ossidazione dei composti organici e minerali azotati che si trovano nel suolo, è stata da parecchi anni argomento di studio indefesso di chimici e batteriologi. Si era tentato di spiegare questo fenomeno, detto nitrificazione, per mezzo di processi chimici semplici, ma per ottenere in tale modo la trasformazione dei composti azotati in acido nitrico, occorrono o temperature elevate, o reazioni energiche, che certamente non intervengono nei fenomeni di ossidazione che si compiono nel terreno.

Dopoche Pasteur ebbe dimostrato quanta parte prendono i microrganismi nella trasformazione della materia, parecchi autori riuscirono a dare le prove sperimentali che la nitrificazione si compie pure per l'azione di germi micro-

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto Chimico della R. Università. Laboratorio Batteriologico della Divisione di Sanità.

scopici che si trovano in tutte le terre vegetali e che lavorano per distruggere le diverse sostanze organiche complesse, formando a spese di quelle azotate dei nitrati, quando siano date condizioni favorevoli di umidità, temperatura, e sia presente l'ossigeno atmosferico.

Winogradski con le sue classiche esperienze riuscì ad isolare gli agenti della nitrificazione, ed a dimostrare che l'azoto ammoniacale viene trasformato in un primo periodo in azoto nitroso e più tardi in azoto nitrico.

Ma se nel terreno esistono microrganismi atti a rendere l'azoto in una forma assimilabile dalle piante, se ne trovano pure altri che lo fanno passare dallo stato combinato allo stato libero.

Nel terreno, nei cumuli di materiali organici azotati (concimi, ecc.) si compie un processo non più di ossidazione dell'azoto, ma di riduzione, tantochè questo è liberato dalle sue combinazioni. Dobbiamo a Wagner importantissime ricerche su questo argomento della denitrificazione. Mettendo questo sperimentatore determinate quantità di feci di cavallo in una data soluzione in acqua comune di nitrato sodico, egli vide che dopo pochi giorni questo andava diminuendo, fino a scomparire del tutto. A quali specie di germi appartenessero gli agenti di questo importantissimo fenomeno di riduzione, Wagner non l'ha stabilito.

Continuando le ricerche di Wagner, Burri e Stutzer isolarono dalle feci di cavallo due specie di batteri le quali in simbiosi godono della proprietà di ridurre l'acido nitrico fino ad azoto libero. Una di tali specie era il bacterium coli, molto sparso in natura, l'altra specie era rappresentata da un germe nuovo a cui diedero il nome di *B. Denitrificans I.* Gli stessi autori hanno isolato poi dalla vecchia paglia di un fiasco un altro bacterio, il quale, a differenza dei primi, è capace da solo di ridurre i nitrati fino ad azoto libero, ed a questo diedero il nome di *B. Denitrificans II.*

Come dunque si vede, la riduzione dell'acido nitrico in azoto libero, non è una proprietà riservata ad una sola specie batterica. Scopo del nostro lavoro fu vedere se il fenomeno della denitrificazione si compiesse oltrechè con le feci di cavallo anche con quelle dei bovini, e se fosse possibile isolare altri germi che non fossero quelli descritti da Burri e Stutzer.

Ripetendo, come fecero Burri e Stutzer, le prove di Wagner, abbiamo messo in bevute di Erlemmeyer, acqua di condottura (acqua Felice), feci di bovino e nitrato sodico nelle proporzioni seguenti:

Acqua	gr.	100
Feci	"	5
NaNO ₃	"	0,32

Questo miscuglio tenuto in termostato a 30° mostrò dopo 24 ore delle bollicine, le quali, sollevandosi dal fondo, si raccoglievano alla superficie in

una schiuma a grandi e piccole bolle, alta più di 2 cm. Questa schiuma, come risulta dalle esperienze di Burri e Stuttzer, è l'indice sicuro dell'avvenuta fermentazione nel liquido. Nelle numerosissime prove da noi fatte, abbiamo potuto riconoscere sempre che quando non si sollevavano più dal fondo bolle di gas, era completa la distruzione dei nitrati.

Queste esperienze abbiamo ripetuto, ottenendo gli stessi risultati, cioè la riduzione del nitrato, sostituendo all'acqua di condotta (acqua Felice) acqua sterilizzata.

Le prove di Wagner, colle quali noi abbiamo incominciate le nostre esperienze prima di procedere alle operazioni di isolamento, ci fornirono il mezzo di riconoscere la costante presenza di germi denitrificanti nelle feci dei bovini, giacchè con più di 30 campioni raccolti da animali diversi, abbiamo avuta la distruzione del nitrato, tutte le volte che ci siamo messi nelle dovute condizioni di esperienza. Veramente, nelle prime prove, fatte al solo scopo di vedere se aveva luogo o no la riduzione dei nitrati, avevamo creduto di poterci dispensare dall'attenerci scrupolosamente alle proporzioni stabilite in:

Acqua	gr.	100
Feci	"	5
NaNO ₃	"	0,32

limitandoci a fare grossolanamente un miscuglio che portavamo in termostato.

Or bene, in tutti questi casi o non abbiamo avuta fermentazione, o il fenomeno è avvenuto in modo molto irregolare ed incompleto. Quando invece abbiamo fatto rigorosamente i miscugli nelle proporzioni indicate per le prove di Wagner, abbiamo ottenuta la distruzione del nitrato anche colle feci di quei bovini che prima non avevano provocato nessuna fermentazione.

Il gas che sviluppò in queste prove e che raccogliemmo in campanella su acqua bollita, non fu soltanto azoto. Infatti 38 cc. di gas raccolto alla temperatura di 28° ed alla pressione di 754,60 si ridussero a 25,8 per eliminazione di anidride carbonica con idrato potassico e rimasero inalterati con pirogallato potassico. La presenza di anidride carbonica fu constatata anche con l'acqua di barite.

Nei recipienti avevamo cura di saggiare qualitativamente alcuni dei prodotti della fermentazione, nel tempo in cui il fenomeno si compieva e dopo che questo era compiuto. Abbiamo ricercata la presenza dei nitrati con la reazione di E. Kopp, cioè colla solfodifenilamina, quella dei nitriti con la reazione di Griess, con acido solfoanilico e solfato di naftilamina, l'ammoniaca col reattivo di Nessler (1).

(1) Quando le prove con reattivo di Nessler si facevano con tubi contenenti brodo, avevamo cura di non riscaldare in presenza di idrato potassico, poichè questo avrebbe messa in libertà ammoniaca dai composti albuminoidi.

In tutte le prove fatte abbiamo sempre trovato i prodotti intermedi della riduzione da acido nitrico in azoto, cioè acido nitroso ed ammoniacca. In capo ad un mese circa non si trovava più traccia di nitrato nel liquido di Wagner.

Riconosciuto il fenomeno e la sua costanza coll'impiego delle feci dei bovini, abbiamo proceduto all'isolamento dei germi denitrificatori colla scorta dei lavori di Burri e Stutzer. A brodo di cultura di Löffler, abbiamo aggiunto 0,32 % di nitrato sodico. Una goccia del materiale contenuto nei recipienti che avevano servito per le prove di Wagner, trasportata in brodo, dava luogo dopo 24 ore ad intorbidamento e dopo 2, 3, 4 giorni e più determinava lo sviluppo di gas con fini bolle, che fermandosi alla superficie si ammassavano in una bianca schiuma; quando il fenomeno era nella massima intensità, facevamo un trasporto in altri tubi, i quali a loro volta mostravano gli stessi fenomeni.

Dobbiamo fare osservare che nei primi trasporti, cioè quando nel liquido di cultura avevamo certamente un numero notevole di specie batteriche, il fenomeno della schiuma, non si verificava con molta regolarità, giacchè abbiamo avuto spesso la sua comparsa dopo 4, 6, 8 ed anche dieci giorni.

Di mano in mano che le culture si purificavano coi successivi trasporti, il tempo della comparsa della schiuma si faceva sempre più breve, e siamo giunti ad averla costantemente in 24-30 ore all'8° o 9° trasporto. Arrivati a questo punto, coll'esame microscopico ci siamo convinti di avere a fare con un germe in cultura pura. Infatti, avendo coltivato un po' di brodo nelle piatte di gelatina nitrata al 0,30 %, allestite secondo il metodo di Koch, abbiamo ottenuto lo sviluppo di colonie tutte del medesimo aspetto.

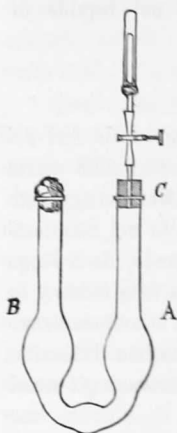
I trasporti fatti da queste colonie in brodo nitrato sono stati seguiti dallo sviluppo caratteristico delle bolle di gas alla superficie del liquido.

Colle culture in serie siamo riusciti dunque ad avere per sopravvento lo sviluppo in cultura pura di un germe diverso da quelli descritti da Burri e Stutzer, pel quale proponiamo il nome di *B. Denitrificans agilis* ed i cui caratteri descriveremo quanto prima.

Avuto il bacterio in cultura pura, abbiamo voluto constatare chimicamente se il gas che si svolgeva era solamente azoto o se non era mescolato ad anidride carbonica che, come abbiamo accennato, si ottiene quando si studia il processo di denitrificazione con l'intervento delle numerose specie batteriche che trovansi nelle feci dei bovini.

A questo scopo ci siamo serviti di un apparecchio (v. figura) il quale

ci permise di raccogliere il gas sviluppatosi, mettendoci nello stesso tempo al sicuro da ogni possibile inquinamento del contenuto.



In un tubo ad U mettevamo brodo nitrato fino a riempire per $\frac{4}{5}$ le due bolle laterali. Sterilizzato l'apparecchio, chiuso alle due estremità da tappi di ovatta, in autoclave a 115° per $\frac{1}{2}$ ora, applicavamo ad una delle bocche un tappo di gomma C attraversato da un tubo che si continuava sopra in un altro di gomma e poi con altro tubetto di vetro. Su quest'ultimo si applicava e si teneva in sito con un po' di cotone, una piccola campanella di vetro. Il tappo con le parti annesse veniva sterilizzato in autoclave dentro una grossa provetta.

Infettato il brodo ed applicato il tappo di gomma al posto di quello di cotone all'estremità della branca A, soffiando aria attraverso il tappo di ovatta della branca B, il liquido veniva spinto nella branca A fino a comparire nel tubo protetto dalla campanella. Mediante una morsetta Mohr si chiudeva allora il tubo di gomma e si portava l'apparecchio in termostato a 35° - 36° . Dopo 18-24 ore si aveva abbondante sviluppo di gas il quale si raccoglieva in A respingendo il livello del liquido. Liberato l'apparecchio dalla campanella, lo mettevamo in comunicazione con un azotometro, nel quale saggiavamo il gas.

In una prova si ottennero cc. 15 di gas che all'analisi risultarono:

cc. 13 di N
• 2 • CO₂

alla temperatura di 25° ed alla pressione di mm. 758,60.

Venivamo dunque a constatare anche col bacterio in cultura pura sviluppo di anidride carbonica nella proporzione del 15 % circa del gas sviluppato.

In questa Nota preliminare ci limitiamo ad accennare ai principali fatti osservati. È nostro intendimento continuare questo studio, avvalorandolo con analisi quantitative e tentando di spiegare come l'azoto venga liberato dalle sue combinazioni, e specialmente come avvenga l'ultimo stadio della riduzione dell'ammoniaca in azoto libero.

Al dott. Sclavo, per gli aiuti di cui ci fu largo, porgiamo i nostri migliori ringraziamenti.

BIBLIOGRAFIA

- Hoppe Seyler, *Arch. f. öffentl. Gesundheitspflege in Elsass Lothringen*, Bd. 8, S. 15.
Schloesing, *Comptes Rendus*, 1873 e 1889.
Schloesing e Müntz, *Comptes Rendus*, 1877-1879.

- Müntz, Comptes Rendus, 1891.
Müntz et Marcano, Annales de Chimie et de Physique, 1887.
Warington, *Reports of experiments made in the Rotham sted laboratory*. Londres.
Winogradsky, Annales de l'Institut Pasteur, 1890, 1891; e Comptes Rendus, 1891.
Dehéraïn et Maquenne, *Reduction des nitrates*. Comptes Rendus., 1882.
Gayon et Dupetit, *Reduction des nitrates*. Comptes Rendus, 1882.
Wollny, Huffelmann Arch. f. Hygiene, 4 Bd., 1 Heft, München und Leipzig, 1886.
Burri e Stutzer, Journal Landwirtschaft, 1894.
" " Central Blatt, 1885.
Breal Contrand Tecnick, 1892.
Heraeus Greithsit fur Hygiene B. 1.
Frenchlender Centralblatt V. 12.
Giltay e Aberson Archivii Olandesi, T. XXV.
Celli e Marino Zuco, Gazzetta Chimica.
T. Leone, Gazzetta Chimica.
Ellen H. Richards. e George William Rolfe, Technology Quarterly, V. IX, 1896.

Chimica. — *Contribuzione allo studio micrografico di alcuni cementi italiani*. Nota di L. BUCCA e G. ODDO, presentata dal Socio S. CANNIZZARO.

Il tentativo fatto da Le Chatelier ⁽¹⁾ di applicare il microscopio allo studio dei cementi idraulici, benchè sia ben lungi dal chiarirci in modo ben netto la ragione chimica e fisica della loro presa e darci dei criteri di classificazione per la loro bontà, ha però aperto un nuovo campo di ricerche, dal molteplice contributo delle quali, accompagnato dagli esperimenti sintetici, si potrà col tempo far molta luce in questa parte ancora molto oscura della chimica industriale.

Siccome ogni nuovo contributo, per quanto piccolo, può giovare ad affrettare la risoluzione dell'arduo problema, così abbiamo creduto utile pubblicare i risultati delle ricerche microscopiche su alcuni cementi italiani delle fabbriche più importanti, sui quali sono state anche eseguite delle ricerche chimiche da uno di noi e Manzella ⁽²⁾.

Chiameremo questi cementi naturali, perchè ottenuti direttamente dalla cottura di marne più o meno ricche d'argilla. Ci limiteremo per ora a intrattenerci dei cementi a lenta presa. Il materiale di partenza, ossia le marne, al microscopio ci presentano la struttura delle rocce detritiche, con frammenti di calcare, raramente quarzo e con una pasta molto oscura, formata

⁽¹⁾ Le Chatelier, *Recherches expérimentales sur la constitution des mortiers hydrauliques*. Ann. d. Mines. 1887. p. 345.

⁽²⁾ Oddo e Manzella, *Ricerche su alcuni cementi italiani ed esteri*. Rend. d. Accademia Lincei, vol. IV, 2° sem., p. 19. — *Ricerche sui fenomeni che avvengono durante la presa dei cementi*. Ibidem, vol. IV, 2° sem., p. 38.