33. PROPRIETÀ DISINFETTANTI DELLA CALCIOCIANAMIDE.

La calciocianamide — oltre alle sue ben note proprietà disinfestanti da me poste in evidenza ([1]) e sulle quali esiste ormai una letteratura mondiale — eserciterebbe anche, secondo le attestazioni di vari Autori di cui si dirà tra poco, una spiccata azione sui batteri del terreno.

Quest' azione — messa in evidenza dall' Allison ([2]) — si manifesterebbe in modo strano, in quanto che la calciocianamide determinerebbe, in ultima analisi, un imponente aumento del numero dei germi contenuti nei terreni trattati.

Ecco quanto esattamente osservò l'Allison: egli mescolava 500 gr. di terra con 107,5 cc. di acqua e dosi scalari di calciocianamide: 5, 10, 25, 50 gr.; il tutto in un bicchiere coperto da un vetro da orologio e lasciato a temperatura ambiente; egli aggiungeva, poi, acqua mano mano che questa evaporava.

Successivamente seminava a piatto in terreno di Lipman e Brown e contava le colonie sviluppatesi constatando come, adoperando poca calciocianamide (5 o 10 gr.), si avesse scarso aumento del numero dei germi, rispetto al controllo; adoperando più calciocianamide (25 gr.), si avesse forte aumento, e come adoperando 50 gr. si avesse una diminuzione rispetto al controllo.

L' Allison constatò, poi, che il massimo aumento del numero dei germi si otteneva due settimane dopo l'applicazione della calciocianamide. In un caso egli constatò come, in un terreno trattato, il numero dei germi rinvenuti dopo due settimane fosse 70 volte superiore a quello del controllo.

L'Allison non seppe dare una spiegazione al fenomeno nè attribuire l'aumento dei germi riscontrati all'azione della calce o della cianamide e ciò anche per il fatto che, adoperando solo ossido di calcio, egli ottenne un aumento dei germi se pure non in così alta proporzione come con la calciocianamide, per cui egli concluse che l'aumento dei germi doveva attribuirsi ai due prodotti di decomposizione della calciocianamide e con prevalenza alla cianamide.

Successivamente il Wolff ([3]) compì esperienze analoghe a quelle dell'Allison estendendole però a nove tipi di concimi chimici: nitrati, solfato di ammonio, calciocianamide, superfosfato, scorie di Thomas, fosfati di Renania, fosfati di Algeria, cainite e sali di potassio, giungendo alla conclusione che solo la calciocianamide fa, a distanza di tempo, aumentare il numero dei germi nei terreni trattati.

Il fenomeno fu ripreso in studio da Kuhn e Drechsel ([4]) i quali riconfermarono che la calciocianamide ha un'azione specifica di accrescimento sui batteri; sostenendo, però, che quest'azione specifica non è dovuta nè allo svolgersi di cianamide pura, nè al formarsi d'idrato di calcio, ma che essa è probabilmente da riferirsi alla sua azione quale miscela chimica.

Essi constatorono, infine, che l'azione di accrescimento esercitata dalla calciocianamide sui batteri è ostacolata e indebolita dall'acidità del terreno ed è invece favorita da uno stato neutro o alcalino del terreno stesso.

Il Wolff ritornò — in collaborazione con Wolff G. ([5]) — sul problema per studiarlo un po' più da vicino e constatò come, nelle prime 24 ore, la calciocianamide determina nei terreni trattati una diminuzione dei germi. Questo fenomeno sarebbe dovuto, secondo i due Autori, « all'azione della cianamide libera che provocherebbe nel terreno un processo di sterilizzazione (analogo a quello che si ottiene per azione del calore), per cui vengono uccisi i germi che, come le muffe e gli sporigeni, sono dannosi in quanto si sviluppano rapidamente e abbondantemente sottraendo sostanza nutritiva e spazio ai germi che hanno un'azione favorevole. In un secondo tempo, la calciocianamide determina un aumento progressivo di questi ultimi germi ».

Lo Schmalfuss ([6]) confermò le oservazioni dei due Wolff per quello che riguarda la diminuzione iniziale del numero dei germi contenuti in terreni calciocianamidati e il loro successivo aumento. Egli non ci sa dire, però, se questo aumento sia dovuto alla cianamide o alla calce; e suppone che esso sia da mettersi in rapporto con la maggior capacità del terreno concimato a fissare l'anidride carbonica.

Per ultimi, Haenseler e Moyer ([7]) confermano ancora una volta il fenomeno constatando come la diminuzione iniziale del numero dei germi sia da riferirsi tanto ai funghi che ai batteri e agli actinomiceti, e come la massima diminuzione si abbia nei terreni in cui, dopo la concimazione, si raggiunge una reazione vicina alla neutra piuttosto che in quelli in cui

la reazione permane acida. Essi constatarono infine come, dopo questa prima temporanea diminuzione, si abbia un notevole aumento dei germi — in un caso 92 volte il numero di quelli riscontrati nel controllo — e come, dopo 30 giorni, il contenuto microbico del terreno ritorni alla sua media normale.

Dalla letteratura risulta, quindi, che la calciocianamide, sparsa sui terreni, fa in un primo tempo diminuire il contenuto microbico di questi, in un secondo tempo lo fa aumentare, mentre in un terzo tempo tutto torna al normale. Il fenomeno è più appariscente nei terreni alcalini e neutri, quasi nullo in quelli acidi.

Meccanismo di produzione del fenomeno praticamente ignoto; fantasiose, dal punto di vista batteriologico, le interpretazioni che la calciocianamide ucciderebbe i germi dannosi dando così possibilità ai germi utili di moltiplicarsi liberamente non più sopraffatti dagli altri. Ove fosse vero quanto affermano i due Wolff, che gli sporigeni sono uccisi, a più ragione dovrebbero morire gli asporigeni anche se benefici.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ ★ BIBLIOTECA

Così stando le cose, ho voluto sperimentalmente vedere se la calciocianamide possedesse o meno proprietà battericide.

A questo scopo ho condotto i miei esperimenti prescindendo da qualsiasi considerazione di carattere agricolo, pur rimanendo, nelle dosi impiegate, entro limiti agrariamente tollerabili.

Nella prima serie di esperienze condotte, ho proceduto nella seguente maniera: scioglievo 1 gr. di calciocianamide greggia in 100 cc. di acqua sterile, filtravo, poi, per trattenere il carbone e le altre impurità insolubili e nel filtrato versavo 2 cc. di una brodocultura di *Bacterium coli* di 24 h. Insemenzavo successivamente in piastre di agar cc. 0,1 e 0,2 di liquido al decimo, ventesimo, trentesimo e sessantesimo minuto e dopo una, due, tre, quattro e ventiquattr' ore. Come controllo usavo 100 cc. di acqua inquinata con 2 cc. di brodo-cultura di *Bacterium coli* di 24 h.

Dirò subito che nel controllo così allestito si sviluppa una incalcolabile miriade di colonie di *Bacterium coli*.

Nelle piastre, invece, insemenzate colla soluzione di calciocianamide inquinata si ha assoluta sterilità già dopo dieci minuti di contatto. Adoperando lo stafilococco aureo o il bacillo del tifo i risultati non cambiano.

Ho condotto, poi, un'altra esperienza in tutto analoga alla precedente colla variante che inquinavo le soluzioni di calciocianamide e di idrato di calcio (pH 12,5) con palline di vetro sporifere (spore carbonchiose) anzichè con batteri. Anche in questo caso si è avuto risultato positivo: nelle successive semine, infatti, le palline rimaste a contatto delle soluzioni per oltre 8-10 ore, non hanno dato luogo a sviluppo.

Queste prime esperienze, ripetute più volte, ci dicono che *la calciocianamide in soluzione all'*1 % *possiede capacità battericide e sporicide.*

Non mi sono, però, fermato qui. Ho voluto andare oltre allo scopo di cercare di comprendere a qual fattore fosse da attribuirsi questa capacità battericida della calciocianamide. Ho istituito, così, un'altra serie di prove aggiungendo un secondo controllo costituito da una soluzione di idrato di calcio ad egual pH (12-12,5) della soluzione di calciocianamide.

I risultati conseguiti sono stati identici con le soluzioni di calciocianamide e con quelle di idrato di calcio nel senso di avere ottenuto azione battericida totalitaria con ambedue le soluzioni.

Da questa seconda serie di esperienze si trae, quindi, la conclusione che *l'azione battericida della calciocianamide è da attribuirsi all'idrato di calcio che si forma nelle soluzioni della calciocianamide stessa.*

In una terza serie di esperienze ho ripetuto le prove come nella seconda serie con differenza che questa volta, prima di inquinare le soluzioni, facevo gorgogliare nei matracci contenenti le soluzioni di calciocianamide e di idrato di calcio anidride carbonica allo scopo di diminuire il pH del mezzo.

Nelle successive semine potei così onstatare come, abbassando il pH, diminuisca di pari passo il potere battericida sino a ridursi a zero. Anche un abbassamento minimo del pH è sensibilissimo sullo svolgersi dell'azione battericida, poichè una soluzione di calciocianamide, il cui pH è stato portato a 11, è incapace di sterilizzare lo stesso numero di germi ch'essa era capace di uccidere quando la soluzione aveva un pH di 12,5, pur riuscendo a ucciderne ancora un fortissimo numero; così, per citare un caso, mentre in una esperienza si è avuto, nel controllo, sviluppo di un incalcolabile numero di colonie, nelle piastre insemenzate con i germi prelevati dalla soluzione di calciocianamide con pH 12,5 non si è sviluppato nulla; in quelle insemenzate con i germi provenienti dalle soluzioni a pH 11 (prelevati dopo 30 minuti di contatto) si sono sviluppate 948 colonie.

Adoperando lo stafilococco aureo o il bacillo del tifo al posto del *Bacterium coli,* i risultati non cambiano. Per quello che riguarda l'azione sporicida, essa cessa completamente quando il pH è a 11,5.

Da questa terza serie di esperienze se ne trae la conclusione che *il potere battericida e sporicida delle soluzioni di calciocianamide è da mettersi in rapporto con l'elevato pH delle soluzioni stesse, dovuto appunto all'idrato di calcio presente nelle soluzioni.*

Ho voluto, infine, sperimentare l'azione battericida della calciocianamide direttamente sulla terra. Mi sono servito di terra di giardino che facevo leggermente prosciugare in laboratorio e che poi setacciavo per evitare di avere grossi grumi. In seguito a una serie di prove fatte ho potuto convincermi che 100 cc. di una soluzione di calciocianamide all'1 % sono capaci di esercitare una controllabile azione battericida soltanto su gr. 0,25 di terra trattata come sopra. Con questa quantità, mentre nei controlli (gr. 0,25 di terra in 100 cc. di acqua sterile) si ha un incalcolabile numero di colonie, nella terra trattata con calciocianamide si ha, già dopo 5 minuti di contatto, una notevolissima diminuzione dei germi tanto che non si riescono a coltivare che una trentina di colonie circa che scendono a poco a poco sino a ridursi a tre o quattro o a volte a nessuna dopo 24 ore.

Per vedere se ero in presenza di una reale azione battericida e non di una semplice azione batteriostatica, e anche per constatare quanto ci fosse di vero nelle affermazioni dei già citati Autori che sostengono aversi, dopo una prima diminuzione, un successivo aumento del numero dei germi superiore a quello di partenza, ho conservato i matracci per un mese praticando culture ogni 5 giorni. Ho potuto, così, constatare come l'azione svolta dalla soluzione di calciocianamide sia realmente battericida e non batteriostatica, poichè i matracci che risultavano sterili dopo 24 ore tali rimasero dopo 5, 10, 15, 20 e più giorni

Da questa ultima serie di esperienze risulta, quindi, che *le soluzioni di calciocianamide esercitano la loro azione battericida anche sui germi presenti nella terra, germi che muoiono realmente e che non aumentano di numero in un secondo tempo.*

Discussione.

Da quanto abbiamo fin qui esposto risulta, dunque, che la calciocianamide possiede un indiscutibile potere battericida da mettersi in rap-

porto, però, non con il gruppo CN della sua molecola, ma con il calcio che a contatto dell'acqua dà l'idrato di calcio.

Il potere battericida di quest' ultimo è in diretto rapporto con il pH della soluzione: abbassandosi il pH, diminuisce infatti, e poi scompare, il potere battericida. Questo fatto è una conferma che il gruppo CN non entra per nulla nell'azione battericida; infatti, in una esperienza analoga da me fatta per dimostrare l'azione parassiticida della calciocianamide — da attribuirsi, questa, al gruppo CN — dimostravo ([8]) come neutralizzando il pH — facendo ugualmente gorgogliare nella soluzione anidride carbonica, in modo da trasformare l'idrato di calcio in carbonato di calcio insolubile e inattivo — il potere parassiticida della soluzione rimaneva integro.

Il fatto che l'azione battericida della calciocianamide sia da mettersi in rapporto con la forte alcalinità della sua soluzione, spiega le osservazioni di Kuhn e Drechsel ([4]) e di Haenseler e Moyer ([7]) i quali constatarono come i terreni acidi ostacolassero e indebolissero l'azione battericida della calciocianamide; e ciò è logico, in quanto che l'acidità del terreno fa abbassare l'alcalinità della soluzione di calciocianamide, indebolendo, così, o annullando addirittura ogni suo potere disinfettante.

Quanto alla concorde constatazione dei vari Autori che nei terreni trattati con calciocianamide si ha prima una diminuzione di germi, poi un notevole aumento di essi e infine un ritorno alla norma, ciò non può e non deve mettersi in rapporto con un' azione diretta della calciocianamide sui germi stessi — nel senso che essa sappia discriminare la sua azione e agire sui germi sporigeni e non sugli asporigeni, sui germi a cellule grandi e non su quelli a cellule piccole, come scrivono i Wolff ([5]) — ma deve mettersi in rapporto con le mutate condizioni nutritive del terreno, il quale, concimato dalla calciocianamide, è divenuto ottimo terreno di cultura anche per i germi che nel terreno pullulano.

Evidentemente sul terreno avviene il seguente ciclo: la prima applicazione della calciocianamide comporta, per la formazione di idrato di calcio, una rapida distruzione dei germi presenti; successivamente, neutralizzandosi l'idrato di calcio con l'anidride carbonica dell'aria o con quella che circola nel terreno, la sua azione battericida cessa; nel frattempo la cianamide si è a sua volta trasformata fertilizzando il terreno sul quale i germi, eventualmente sopravvissuti all'azione disinfettante o

ivi nuovamente pervenuti per una delle infinite cause che regolano la distribuzione dei germi sul terreno, si moltiplicano attivamente dato il variato e più favorevole pH del terreno (tra 7,5 e 8 dopo qualche tempo dalla concimazione) e l'ottimo *pabulum* a loro disposizione; in un terzo periodo, quando le eccezionali risorse del terreno si sono esaurite, il terreno stesso non può più dar da mangiare a tanti germi i quali si riducono al numero normale che, in condizioni abituali, può su quel terreno vivere.

Conclusioni.

Da quanto abbiamo esposto si possono trarre le seguenti conclusioni:

1) Le soluzioni di calciocianamide sono dotate di potere battericida e sporicida.

2) Questo potere battericida e sporicida è da mettersi in rapporto con l'idrato di calcio che si forma nelle soluzioni e non con la cianamide.

3) L'idrato di calcio agisce in funzione esclusiva della sua alcalinità: diminuendo il pH il potere battericida dapprima diminuisce e poi scompare, quello sporicida si annulla subito.

4) L'aumento dei germi sui terreni concimati con calciocianamide — aumento constatato da molti Autori e preceduto da una forte diminuzione e seguito da un ritorno al normale contenuto microbico del terreno — non è da mettersi in rapporto con una speciale azione della calciociocianamide su questo o quel tipo di germi — fatto, questo, non corrispondente alla realtà sperimentale — ma è evidentemente da attribuirsi alle migliorate condizioni nutritizie del terreno che, dopo la concimazione, è capace di mantenere in vita un maggior numero di germi. Quando queste eccezionali capacità nutritizie del terreno si esauriscono, il numero dei germi diminuisce tornando al normale.

RIASSUNTO

Le soluzioni di calciocianamide sono dotate di potere battericida e sporicida; questo potere è da mettersi in rapporto con l'idrato di calcio che si forma nelle soluzioni, idrato che agisce in funzione della sua forte alcalinità: infatti, diminuendo il pH delle soluzioni, il potere battericida diminuisce e si annulla rapidamente.

SUMMARIUM

Calciocyanamidis solutiones bactericida et sporocida virtute sunt praeditae, quae virtus in calcii consistit hydrato, quod in solutionibus gignitur. Hydratum vero ideo operatur, quod summa est alcalinitate. Nam si solutionum pH aliquan tum imminutum sit, continuo bactericida virtus tenuatur aut cessat.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Batteriologia.

BIBLIOGRAFIA

(1) Penso G., « La calciocianamide quale disinfestante ». Studio monografico fatto sotto gli auspici del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Roma, Salute e Igiene, 1937.

(2) Allison F. E., « The effect of cyanamid and related compounds on the number of microorganisms in soil », Journ. of Agric. Res., *28*, 1159 (1924).

(3) Wolff A., « Ueber die Einwirkung der gebräuchlichen Düngemmittel auf die Bodenbakterienflora », Centrbl. f. Bakt. Par. u. Infk., II Abt., *70*, 41 (1927).

(4) Kuhn J. e Drechsel O., « Der Einfluss des Kalkstickstoffs auf das Bakterienleben im Boden », Ztschrft. f. Pflanzenernäh. u. Bodenk., *7*, 105 (1928).

(5) Wolff A. e Wolff G., « Ueber den Einfluss des Kalkstickstoffs auf die Mikroflora des Bodens », Cntrbl. f. Bakt. Par. u. Infk., II Abt., *81*, 221 (1930).

(6) Schmalfuss K., « Ueber die Wirkung des Kalkstickstoffs und anderer Stickstoffdünger auf die biologische Tätigkeit des Bodens », Bodenk. u. Pflanzenernäh., *2*, 110 (1936).

(7) Haenseler C. M. e Moyer T. R., « Effect of calcium cyanamide on the soil microflora with special reference to certain plant parasite », Soil Science, *43*, 113 (1937).

(8) Penso G., « Meccanismo d'azione della calciocianamide quale disinfestante », Arch. It. di Sc. Med. Col. e di Par., *16*, 517 (1936).