

111. M. J. THIRUMALACHAR. — *Romanoa*, nuovo genere di fungo del terreno con attività antibatterica.

**Riassunto.** — E' descritto un nuovo genere di fungo appartenente alla famiglia delle Clavicipitaceae, isolato dal terreno. Il fungo è caratterizzato da un micelio bianco, che produce periteci superficiali, ialini, lageniformi, con apici ottusi. Gli aschi sono aparafisati, leggermente clavati, contengono otto ascospore filiformi, settate e all'apice sono provvisti di una capsula ialina, trasparente. Il fungo viene ascritto ad un nuovo genere, *Romanoa*, indicando la specie *Romanoa terricola*.

In cultura sommersa *R. terricola* produce « sprout cells ». Il filtrato delle culture sommerse non ha rivelato attività antibatterica contro i microorganismi saggiati, mentre culture in agar si sono mostrate attive contro *Bacillus subtilis* e *Micrococcus pyogenes*.

**Résumé.** — On a isolé et décrit un nouveau champignon du sol de la famille des Clavicipitacées. Ce champignon est caractérisé par un mycélium blanc qui produit des perithécium superficiels, hyalins et lageniformes avec des sommets obtus. L'ascus aparaphysé et étroitement clavé contient huit ascospres filiformes séparés et se couronne d'un revêtement gélatineux hyalin, transparent. On a créé pour ce champignon, un genre nouveau, *Romanoa*, l'espèce étant nommée *Romanoa terricola*.

*R. terricola* produit des cellules germinantes en culture submergée. Les bouillons filtrés n'ont pas montré d'activité contre les organismes examinés, alors que les cultures sur agar avaient une activité anti-biotique contre *Bacillus subtilis* et *Micrococcus pyogenes*.

**Summary.** — A new soil inhabiting fungus of the family Clavicipitaceae has been isolated and described. The fungus is characterised by a white mycelium which produces superficial, hyaline, lageniform perithecia with blunt apices. The asci are aparaphysate and narrowly clavate containing eight filiform, septate ascospores, and are crowned with a hyaline refractive gelatinous cap. A new genus, *Romanoa*, has been erected for this fungus, the type species being named *Romanoa terricola*.

*R. Terricola* was found to produce sprout cells when grown in submerged culture. Broth filtrates had no antibacterial activity against the organisms tested, whereas agar cultures showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Micrococcus pyogenes*.

**Zusammenfassung.** — Eine neue Art von Bodenpilz der Familie Clavicipitaceae wurde isoliert und beschrieben. Kennzeichen des Pilzes ist ein weisses Mycelium, das durchsichtige flaschenförmige Oberflächen-Perithecia mit stumpfer Spitze hervorruft. Die Asci sind aparaphysisch und klumpenförmig und enthalten acht fadenförmige mit einem Saeptum versehene Askosporen und sind mit einer durchsichtigen refraktiven, gelatineartigen Kapsel versehen. Für diesen Fungus wurde ein neues Genus die ROMANOA, geschaffen, wobei die Species *Romanoa terricola* benannt wurde.

Es wurde gefunden, dass die *Romanoa terricola* in flüssiger Kultur Samenzellen hervorbringt. Bouillonfiltrate zeigten bei den Versuchsorganismen keine bakterientötende Wirkung, während Agarkulturen sich Wirksamkeit gegen *Bacillus subtilis* und *Micrococcus pyogenes* aufwiesen.

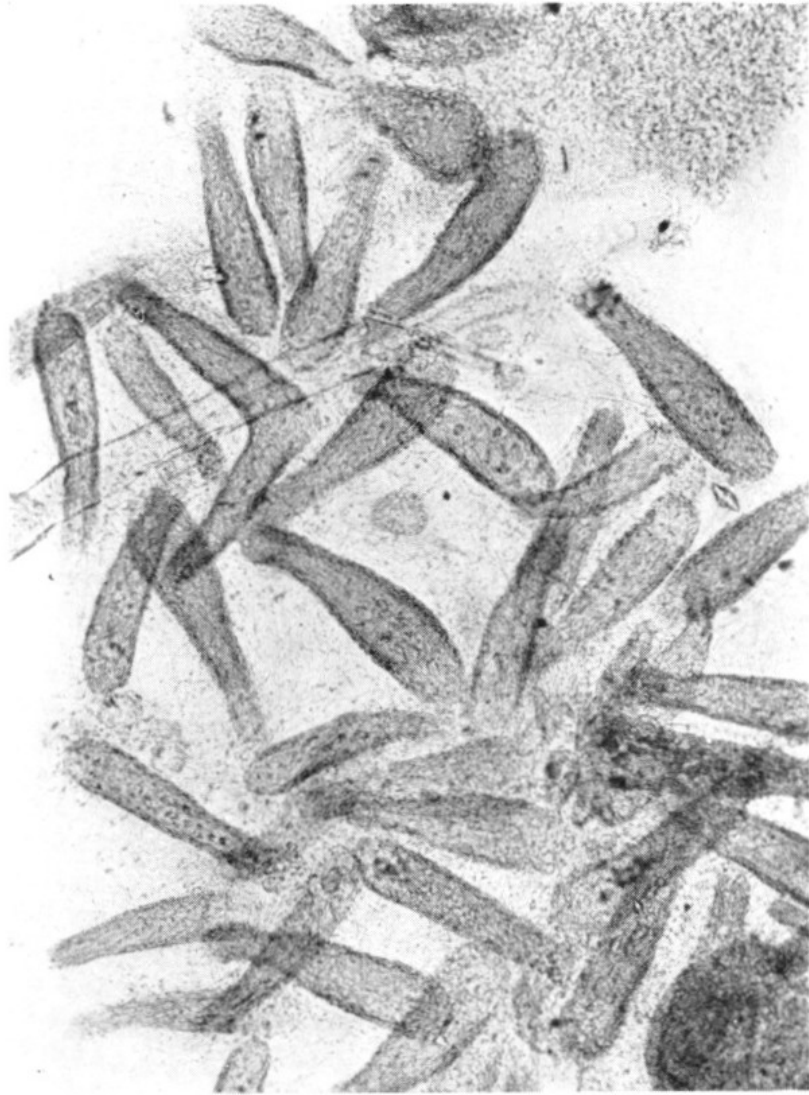
---

#### INTRODUZIONE

Durante le osservazioni e gli studi eseguiti su funghi isolati da campioni di terra raccolti a Roma, è stato osservato un fungo ascomicete che, in seguito ad ulteriori osservazioni, risultò appartenere ad un genere non ancora descritto. Fu notato che il fungo cresceva facilmente su terreni artificiali, formando numerosi periteci e che, oltre ad avere interessanti caratteri morfologici, produceva in agar-culture una sostanza antibiotica che inibiva la crescita di alcuni batteri gram-positivi. Mentre sono pochi gli ascomiceti del terreno conosciuti, se si escludono i gruppi delle Plectascaceae, Sordariaceae, Xylariaceae e Chaetomiaceae, molti funghi appartenenti a queste famiglie sono stati studiati per la produzione di numerosi antibiotici.

#### MORFOLOGIA DEL FUNGO

Il fungo cresce bene in cultura superficiale su buona parte dei terreni semi-solidi saggiati, come agar di Moyer, agar glucosio-peptone, agar Czapek-Dox e altri. Le colonie si presentano bianche, aracnoidi, diffuse e di aspetto granuloso dopo la formazione dei periteci che, essendo ialini non conferiscono alcuna sfumatura scura alle colonie. Il micelio è sottile, lungo, settato e ramificato; i setti sono indistinti nelle ife giovani ma possono essere facilmente osservati in quelle più vecchie. È interessante notare che il fungo non produce forme conidiche alla superficie di agar-



*Fig. 1.* - Periteci in cultura artificiale.  $\times 250$ .



Fig. 2. - Peritecio ingrandito con ostiolo poco sviluppato e aschi aciculari.  $\times$  500.

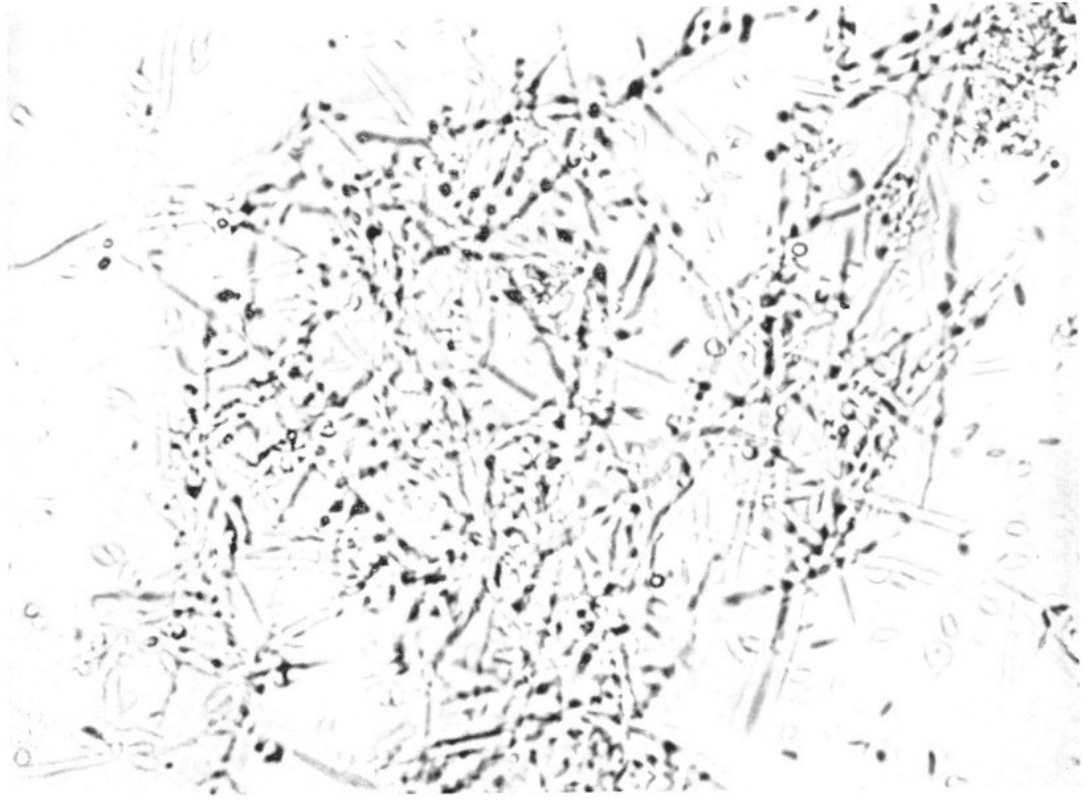


Fig. 3. - Micelio da cultura sommersa producente « sprout cells ».  $\times 900$ .

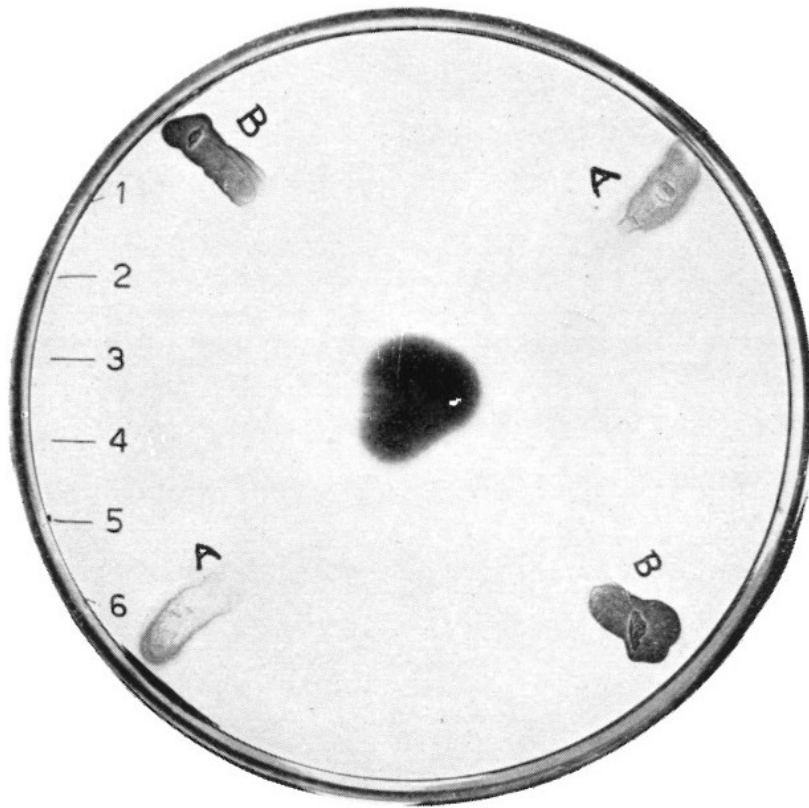


Fig. 4. - Attività antibiotica in agar-cultura contro:  
A) *Bacillus subtilis* e B) *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*.

culture. Quando le culture vengono incubate per molto tempo e lasciate essiccare, le ife giovani ai margini delle colonie diventano notevolmente settate e si spezzano in frammenti simili a *Oidii*.

I periteci sono prodotti in grandi quantità anche in colonie molto giovani, di otto o dieci giorni di età (fig. 1). La differenziazione delle ife fertili e di quelle sterili si rende evidente durante la formazione dei periteci; mentre infatti le ife sterili della colonia sono fiocose e lassamente raggruppate, quelle fertili sono strettamente intrecciate a formare uno strato pseudo-parenchimatico, da cui si differenziano i periteci in masse considerevoli.

I periteci maturi sono ialini, ricoperti da un cordone di ife lassamente ravvicinate, obclavate, lageniformi o vermiformi, mai subglobosi o sferici. Essi sono arrotondati alla base e si vanno assottigliando all'apice, che si presenta papillato. L'ostiolo non è ben differenziato e diventa evidente solo dopo la fuoriuscita degli aschi e delle ascospore. Le pareti dei periteci sono formate da uno strato pseudo-parenchimatico di cellule strettamente ravvicinate, e da uno strato più interno di ife lassamente raggruppate. La parte distale del peritecio è coperta da numerosi apici ifali liberi, che appaiono come protuberanze papilliformi (fig. 2). Gli aschi si formano dalla base del peritecio e mai dalle pareti laterali; essi sono raggruppati in corti peduncoli, aparafisati, lunghi e strettamente clavati, con pareti sottili. Le ascospore sono otto, lunghe, aghiformi, ialine, molto sottili e appaiono scarsamente settate se osservate in preparati microscopici intensamente colorati. Gli aschi sono ricoperti all'apice da una capsula ialina, rifrangente, gelatinosa, che viene eliminata durante la fuoriuscita delle ascospore dagli aschi.

Ponendo un peritecio maturo su un vetrino e facendo una leggera pressione col coprioggetto vengono espulsi i lunghi aschi, e rimane l'involucro del peritecio vuoto. Le ascospore, tuttavia, non sono liberate immediatamente dagli aschi: osservazioni eseguite a questo riguardo hanno messo in evidenza che nella maggior parte dei casi vengono espulsi gli aschi contenenti ancora le ascospore, e che queste fuoriescono più tardi, per eliminazione della capsula gelatinosa. Se piastrate su un terreno nutritivo semi-solido, in molti casi le ascospore germinano mentre sono ancora rinchiusi negli aschi.

#### IDENTIFICAZIONE DEL FUNGO

I caratteri sopra riportati fanno ritenere che il fungo appartenga alla famiglia delle Clavicipitaceae, ordine Hypocreales. Questa famiglia,

secondo MILLER <sup>(1)</sup>, con il genere *Claviceps* Tul. costituisce un gruppo ben definito; vi si trova una capsula molto ben definita all'apice dell'ascogonio, cilindrico, con spore filiformi, che vengono emesse per eliminazione della capsula gelatinosa. In qualche genere sono presenti parafisi e perifisi, che tuttavia scompaiono fin dai primi stadi.

Volendo riferire il fungo in esame a generi strettamente vicini si possono considerare *Ophionectria* Sacc. e *Globulina* Speg. Nel genere *Ophionectria*, cui appartengono specie parassite di Insetti, gli aschi hanno spore aghiformi, ma i periteci sono globosi, mentre nel nostro caso sono lageniformi o vermiformi. Anche il genere *Globulina* descritto da SPEGAZZINI <sup>(2)</sup> con la specie *G. erysiphoides* Speg., parassita delle foglie di una Composita del Brasile, presenta ascospore aciculari, ma i periteci, a differenza del fungo in esame, sono globosi e privi di stoma. Anche la *Globulina trichocarpa* descritta da SYDOW <sup>(3)</sup>, parassita della *Sida carpinifolia* nel Venezuela, non può riferirsi a questo genere, in quanto i periteci si presentano con l'ostiolo ben sviluppato e numerose perifisi. La particolare capsula gelatinosa di cui sono provvisti gli aschi è il carattere distintivo del fungo in esame. Questo, insieme agli altri caratteri sopra riportati, permette di ascriverlo ad un genere separato.

*Romanoa Thirumalachar gen. n.*

Micelio bianco, fioccoso, aracnoide, diffuso. Periteci minuti, superficiali, ialini, obclavati, lageniformi o vermiformi, con apici assottigliati. Aschi leggermente obclavati, aparafisati, con capsula gelatinosa all'apice; ascospore filiformi, ialine, settate. Specie: *Romanoa terricola* Thirumalachar.

Mycelium albidum; floccosum, arachnoideum, effusum. Perithecia minuta, superficialia, obclavata, lageniformia vel vermiformia, hyalina, attenuata ad apicem, obtusa. Asci anguste obclavati, paraphysata, cum corona gelatinosa in apice; sporidia filiformia, hyalina, septata. Species typica: *Romanoa terricola* Thirumalachar.

*Romanoa terricola* Thirumalachar sp. n. (\*)

Colonie bianche; micelio bianco, fioccoso, aracnoide, diffuso, settato e ramificato. Periteci aggregati, ialini, obclavati, lageniformi o ver-

(<sup>1</sup>) MILLER J. H.: A revision of the classification of the Ascomycetes with special emphasis on the Pyrenomycetes. - Mycologia, 41: 99-127 (1949).

(<sup>2</sup>) SPEGAZZINI M.: Fung. Piugg. 300. in Sacc. Syll Fung., 9: 993 (1894).

(<sup>3</sup>) SYDOW H.: Fungi Venezuelani. - Ann. Mycol., 28: 125-126 (1930).

(\*) Sono state depositate culture presso il Centralbureau voor Schimmecultures di Baarn e presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma.

miformi, 147-190 × 27-45, 34-45  $\mu$  alla base, 18-34  $\mu$  all'apice; papillati all'apice, con ostiolo indistinto e pareti membranacee, pseudo-parenchimatice, ialine. Aschi numerosi, stipitati, aparafisati, leggermente obclavati, provvisti di capsula gelatinosa all'apice, 8-spori, 72-133 × 4-5  $\mu$ . Spore ialine, acidulari, settate, 70-100 × 1,2-2  $\mu$ . Isolata dal terreno, Roma (Italia), settembre 1952.

Plagulae albae, mycelium albidum, floccosum, arachnoideum, effusum, septatum, ramosum. Perithecia aggregata, hyalina, obclavata, lageniformia vel vermiformia, 147-190 × 27-45, 34-45  $\mu$  ad basim, 18-34  $\mu$  ad apicem; superne papillata, ostiolo indistincto, pariete membranaceo, pseudoparenchymatico, hyalino. Asci numerosi, stipitati, anguste obclavati, postice corona gelatinosa, 8-spori, 72-123 × 4-5  $\mu$ . Spora hyalina, acicularia, septata, magnitudinis 70-100 × 1-2-2  $\mu$ .

#### SVILUPPO IN CULTURA

Il fungo si è sviluppato sia in cultura superficiale su terreni semisolidi che in cultura sommersa agitata. In diversi terreni agarizzati, come agar di Moyer, agar glucosio-peptone e agar Czapek-Dox, forma colonie biancastre che si estendono e producono abbondanti periteci. In tali culture superficiali non si è messa in evidenza alcuna formazione di conidi; i periteci sono la sola forma fruttifera del fungo.

Non è stato fatto uno studio dettagliato sulle relazioni tra temperatura e crescita del fungo, tuttavia si è visto che in agar di Moyer cresce bene a 24°C. (colonie di 10 giorni raggiungono un diametro di 75-80 mm) mentre sviluppa molto lentamente, o affatto, a 30°C. (in 10 giorni, 3 o 5 mm di diametro).

Nelle culture superficiali in terreni liquidi il micelio forma un denso feltro alla superficie del liquido, producendo numerosi periteci. Per la cultura sommersa agitata sono state usate beute da 500 cm<sup>3</sup> con 125 cm<sup>3</sup> di liquido culturale, poste su agitatore rotatorio con 250 g.p.m. in cella termostatica a 24°, e i seguenti terreni: 1) soluzione di corn steep-glucosio (3% glucosio, 3% corn steep solido, 0,7% CaCO<sub>3</sub>, pH 6); 2) terreno di Moyer non agarizzato; 3) soluzione di peptone-glucosio-estratto di lievito (peptone 1%, glucosio 2%, estratto di lievito 0,3%, NaCl 0,5%, pH 6,8). Le beute erano seminate con frammenti di micelio prelevati da culture superficiali in agar. Osservazioni eseguite dopo 48 ore hanno messo in evidenza che il micelio, dopo uno sviluppo iniziale piuttosto scarso, si è spezzato in numerosi piccoli frammenti. In ciascuno di questi frammenti miceliali si formavano numerose corte ramificazioni somiglianti a conidiofori, e queste davano luogo a numerose cellule gemmanti (« sprout

cells » degli autori anglo-sassoni), come quelle che si notano nelle culture artificiali dei carboni e della *Taphrina* sp. e che producono per gemmazione numerose cellule simili a lieviti. Il terreno di cultura, invece di mostrare crescita miceliale, diventava torbido, e conteneva numerose « sprout cells » insieme a frammenti di micelio. Quando queste cellule venivano sterilmente trasferite su agar di Moyer o altri terreni semi-solidi, si sviluppavano nuovamente caratteristiche colonie miceliali di *Romanoa terricola*. Anche in cultura superficiale su terreni liquidi, si è osservato che la parte sommersa del micelio produceva « sprout cells », ma ciò accadeva solo raramente.

Mentre il fungo allo stato di micelio non cresce affatto su agar o terreni liquidi a temperature di 30°C., si è potuto constatare che le « sprout cells » sono in grado di dare un ulteriore sviluppo a temperature da 30° a 37°C. Inoltre, trasferite in una soluzione di corn steep-glucosio posta su agitatore rotatorio a 30°C. di temperatura le « sprout cells » ne producevano altre secondarie, così da aumentare di numero.

#### ATTIVITA' ANTIBATTERICA

Si è trovato che il fungo, coltivato su agar peptone-glucosio a 24°C. produce una sostanza antibiotica che inibisce la crescita di alcuni batteri gram-positivi. Piastre contenenti culture di 5 giorni su agar peptone-glucosio-estratto di carne venivano strisciate con gli organismi da saggiare e incubate a 37°C. Dopo 12 ore di incubazione si osservavano le seguenti zone di inibizione:

*Bacillus subtilis*: 20 mm

*Micrococcus pyogenes* var *aureus*: 22 mm

*Escherichia coli*: non inibito

*Klebsiella pneumoniae*: non inibito.

Inoltre, dischi di agar di 4 mm di spessore, prelevati ai margini di colonie di 10 giorni di *Romanoa terricola* su agar di Moyer, posti su piastre di agar nutritivo seminate singolarmente con i microorganismi sopra citati, hanno dato gli stessi risultati di inibizione, confermando che la sostanza prodotta dal fungo è attiva solo contro *B. subtilis* e *M. pyogenes* var. *aureus*.

Il filtrato delle culture sommerse non ha rivelato attività contro i microorganismi saggiati. Ciò può esser dovuto al fatto che in queste condizioni lo sviluppo del micelio è molto scarso o nullo, e si formano solo « sprout cells ». I filtrati di culture superficiali in terreni liquidi, dopo 30

giorni di sviluppo a 24°C., hanno rivelato debole attività (zona di inibizione: 10 mm), se saggiati contro *B. subtilis* (ceppo I.C.I.). I fattori che influenzano la massima produzione della sostanza antibiotica in terreni liquidi richiedono pertanto uno studio ulteriore.

L'Autore desidera esprimere la sua profonda gratitudine al prof. E. B. Chain, per il suo consiglio e incoraggiamento, e al dr. Franz Petrak di Vienna per la cortese collaborazione nel confermare l'identificazione del fungo.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica.

---