

36. Wendy M. DION e R. KAUSHAL. (*) — **L'effetto dell'agitazione meccanica sulla morfologia di alcuni funghi comuni sviluppati in coltura sommersa.** (**)

Riassunto. — E' stato studiato l'effetto dell'agitazione meccanica sul comportamento di dieci comuni funghi filamentosi, in culture sommerse.

Si è dimostrato che agitatori con eguale velocità periferica, ma con differente numero di rotazioni per minuto, danno un effetto simile sul comportamento di un dato micete.

I dieci funghi reagiscono in varia maniera all'effetto meccanico, usualmente però nei fermentatori con intensa agitazione si ha un più alto peso secco di micelio.

La morfologia degli *Stachybotrys atra* e dei *Cephalosporium acremonium* non rimane quasi influenzata da differenti velocità di agitazione. Negli *Aspergillus* e *Paecilomyces* invece le ife si presentano corte ramificate e parzialmente autolisate sotto l'influsso di una agitazione intensa, mentre rimangono lunghe e filamentose con una blanda agitazione.

Specie di *Mucor* e di *Haplosporangium* formano con una forte agitazione solo pallette compatte, mentre con agitazione meno intensa formano pallette fiocose e micelio filamentoso.

Rhizopus sp., sviluppato in fermentatori fortemente agitati cresce prima in forma filamentosa ma forma clamidospore e pallette compatte in un secondo tempo.

Summary. — The effect of mechanical agitation on the behaviour of ten common filamentous fungi grown in submerged culture was investigated. It was shown that propellers with equal peripheral speeds but different numbers of rotations per minute had a similar effect on the behaviour of a given fungus.

The ten fungi reacted in various ways to the effect of mechanical agitation, but a higher dry weight of mycelium was usually produced in the fermenters with intense agitation. The morphology of *Stachybotrys atra* and *Cephalosporium acremonium* was almost unaffected whereas the hyphae of *Aspergillus* and *Paecilomyces* became short branched and partially autolysed with intense agitation and remained

(*) Membro dell'OMS.

(**) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 337 (1959).

long and filamentous with mild agitation. Species of *Mucor* and *Haplosporangium* formed only compact pellets with intense agitation whereas with mild agitation loosely constructed pellets and filamentous mycelium were produced. *Rhizopus* sp. grew first in mycelial form later forming chlamydospores, and compact pellets in the well agitated fermenters.

INTRODUZIONE

In una comunicazione antecedente ⁽¹⁾ è stato dimostrato che l'agitazione meccanica ha un effetto pronunciato sull'aspetto morfologico delle ife di *P. chrysogenum* sviluppato in coltura sommersa. Con un'intensa agitazione meccanica le ife si sviluppano in unità corte, rigide e ramificate, mentre restano lunghe e filamentose quando l'agitazione meccanica è blanda. In considerazione di questi risultati si è ritenuto interessante studiare la risposta all'agitazione meccanica di altri funghi filamentosi in coltura sommersa. Per questo scopo si scelsero alcuni funghi comuni del terreno: le ricerche riguardano principalmente osservazioni morfologiche sullo sviluppo delle ife, e non il comportamento biochimico dei funghi.

METODI E MATERIALI

ORGANISMI. — Per questi studi si impiegarono nove funghi, isolati tutti dal terreno: *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Aspergillus niger* van Tieghenn, *Aspergillus glaucus* Link, *Paecilomyces varioti* Bainer, *Stachybotrys atra* Corda, *Cladosporium herbarum* (Pers.) (Link), *Cephalosporium acremonium* (Corda), *Rhizopus* sp., e *Mucor* sp. Il decimo fungo esaminato, che fu isolato da una pigna in putrefazione, era una specie di *Haplosporangium*.

PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE DI SPORE

Si produssero spore in bottiglie di Roux su agar contenente un terreno sporulante della composizione indicata sotto. Dopo dieci giorni le spore furono lavate via con acqua distillata. La sospensione fu portata

ad una densità tale che quando 10 ml furono inoculati in 5 litri di terreno di coltura il numero finale delle spore nel terreno di coltura superava 2.000/ml.

TERRENI DI CULTURA

PER LA PRODUZIONE DI SPORE. — Il terreno di sporulazione, avente come base quello di MOYER e COGHILL (²), aveva la seguente composizione:

Saccarosio	30 g
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
agar	30
corn steep liquor	10 ml
(contenente 50% di solido)	
acqua di fonte	1 l

PER LA PRODUZIONE DI MICELIO VEGETATIVO NEI FERMENTATORI AGITATI: tutti gli organismi furono sviluppati in un terreno di coltura della seguente composizione:

Solidi di corn steep	6%
Glucosio (commerciale)	3%
preparato con acqua di fonte	
Carbonato di calcio	1%
pH aggiustato a 5,0 con acido cloridrico.	

CONDIZIONI DI STERILIZZAZIONE: Per la sterilizzazione i fermentatori contenenti il terreno di coltura furono tenuti per 20 minuti a 100°, e poi per 40 minuti a 125°. Il carbonato di calcio fu sterilizzato separatamente (50 g in 200 ml d'acqua a 125° per 60 minuti).

FERMENTATORI, CONDIZIONI DI AGITAZIONE E DI AERAZIONE: Si adoperano fermentatori in acciaio inossidabile da 10 l (³) con 5 l di terreno di coltura, impiegando sia il sistema di aerazione a vortice sia quello anti-vortice a diffusore. Nella Tabella 1 sono riportati il diametro ed il numero di giri delle eliche adoperate, nonchè le corrispondenti velocità di aerazione misurate con il metodo al solfito (⁴).

Ciascun fungo venne sviluppato in una serie di quattro fermentatori, e si scelsero le condizioni di agitazione e di aerazione in modo da avere velocità elevate di aerazione in due di essi, e velocità basse negli altri due. Si realizzarono le velocità elevate di aerazione mediante il sistema a vortice, adoperando due eliche le cui pale avevano diametri differenti, che furono fatte ruotare con un numero di giri tale che tutte e due diedero velocità di aerazione uguali. Si vede dalla Tabella 1 che, mentre il numero di giri con cui ruotavano le pale delle due eliche differiva quasi del 100%, le loro velocità periferiche differivano soltanto del 26% circa.

TABELLA 1

Sistema di aerazione	Diametro pale eliche	Giri minuto	Velocità periferica (cm/min.)	Sovrapressione (atm)	Flusso aria (l./min)	Velocità aerazione (ml O ₂ per ml 100 soluzione/ora)
1. Vortice .	90 mm	750	212	1.0	—	220
2. Vortice .	65 mm	1450	290	0.5	—	230
3. Vortice .	65 mm	750	154	0.5	—	70
4. Antivortice con diffusore	75 mm	360		0.5	2.5	60

Le basse velocità di aerazione furono ottenute sia con il sistema di aerazione a vortice, sia con quello antivortice a diffusore, ma quest'ultimo causò frequentemente fastidi in seguito alla crescita del micelio oltre il diffusore ed il tubo presa di campione, ostruendo così l'entrata dell'aria e rendendo difficile la presa di campione.

La temperatura di fermentazione era di 30°C.

Tutti gli esperimenti furono eseguiti in duplicato e ripetuti.

INOCULAZIONE

Tutte le fermentazioni furono inoculate con 10 ml di sospensioni di spore per escludere i possibili effetti a cui potrebbe andare soggetto un micelio vegetativo che fosse sviluppato da spore dapprima in un fermentatore da semina in una data serie di condizioni di agitazione ed aerazione, e, successivamente, trasferito in fermentatori di produzione, in condizioni differenti.

ANALISI

Furono determinati ogni 24 ore cambiamenti del pH, peso percentuale secco del micelio e consumo di glucosio, impiegando metodi convenzionali.

OSSERVAZIONI GENERALI

Nel sistema di aerazione a vortice, sia la capacità di disperdere aria sia l'azione di attrito meccanico delle pale dell'elica sul micelio fungino sono determinate principalmente dalle loro velocità periferiche. E' quindi prevedibile che si possano ottenere effetti similari sull'aspetto morfologico di un dato fungo con eliche ruotanti a velocità periferiche uguali, benchè con numeri di giri largamente diversi. D'accordo con queste previsioni è stato trovato con le due coppie di fermentatori con elevate velocità di aerazione (prodotte da eliche di differente diametro ruotanti con differente numero di giri, ma a velocità periferiche uguali) si comportavano in modo simile per quanto riguarda l'aspetto morfologico, cambiamenti del pH, utilizzazione dello zucchero e pesi secchi del micelio formato (figura 1).

I due fermentatori con basse velocità di aerazione, realizzate in un fermentatore dal sistema a vortice e nell'altro dal sistema a diffusore in presenza di piastre antivortice, diedero anch'essi risultati simili. Il fermentatore munito delle piastre antivortice incorse però in frequenti fastidi dovuti a difficoltà tecniche come la crescita del micelio oltre il diffusore e il tubo presa di campione così da bloccare l'entrata dell'aria e rendere difficile la presa del campione. Con il sistema di aerazione a vortice non sorgono tali difficoltà. Gli effetti morfologici osservati in condizioni di bassa aerazione sono il risultato combinato di una riduzione dell'azione di attrito meccanico e di una carenza di ossigeno.

Nonostante il danno meccanico al micelio, le colture bene aerate si svilupparono più rapidamente e raggiunsero un peso secco finale più elevato di quelle che erano meno aerate e non manifestavano alcun danno meccanico. Lo sviluppo delle colture con intensa agitazione era ordinariamente caratterizzato da un aumento costante del pH, che spesso raggiungeva valori superiori a 8, dopo esaurimento completo degli zuccheri; con blanda agitazione l'aumento del pH fu molto lento, con valori che rimanevano generalmente tra 5,5 e 6,5. Questi fatti sono illustrati, per quanto riguarda il *Paecilomyces varioti*, nella figura 1.

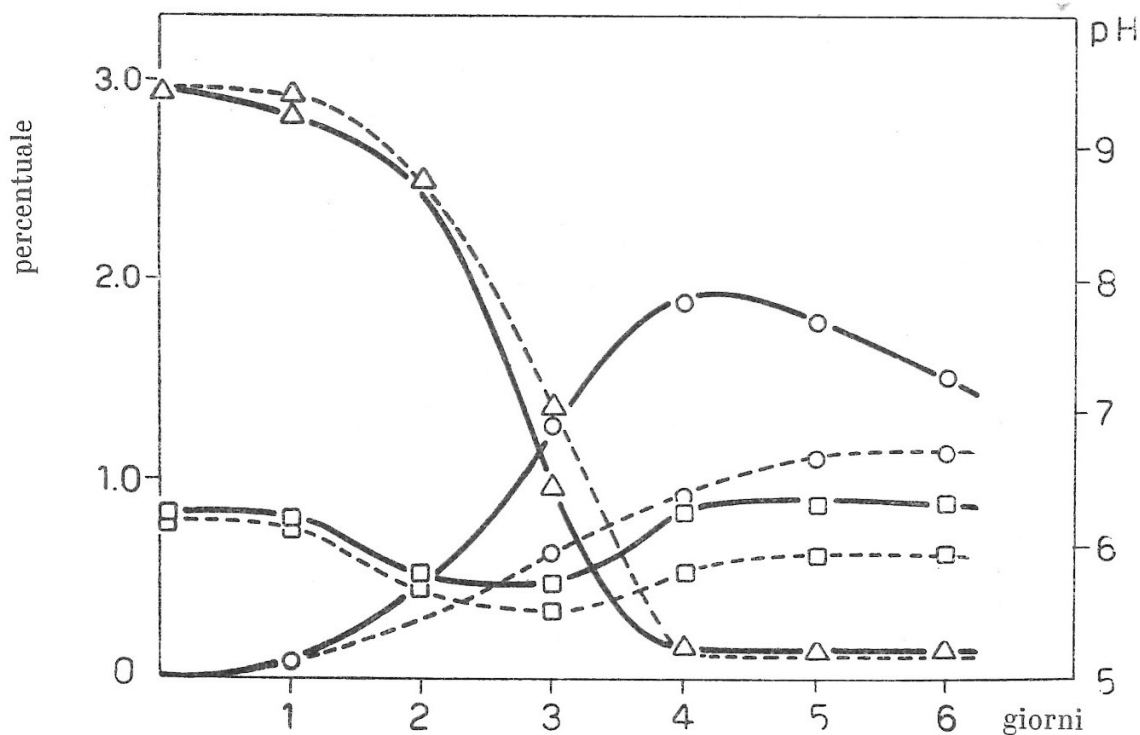
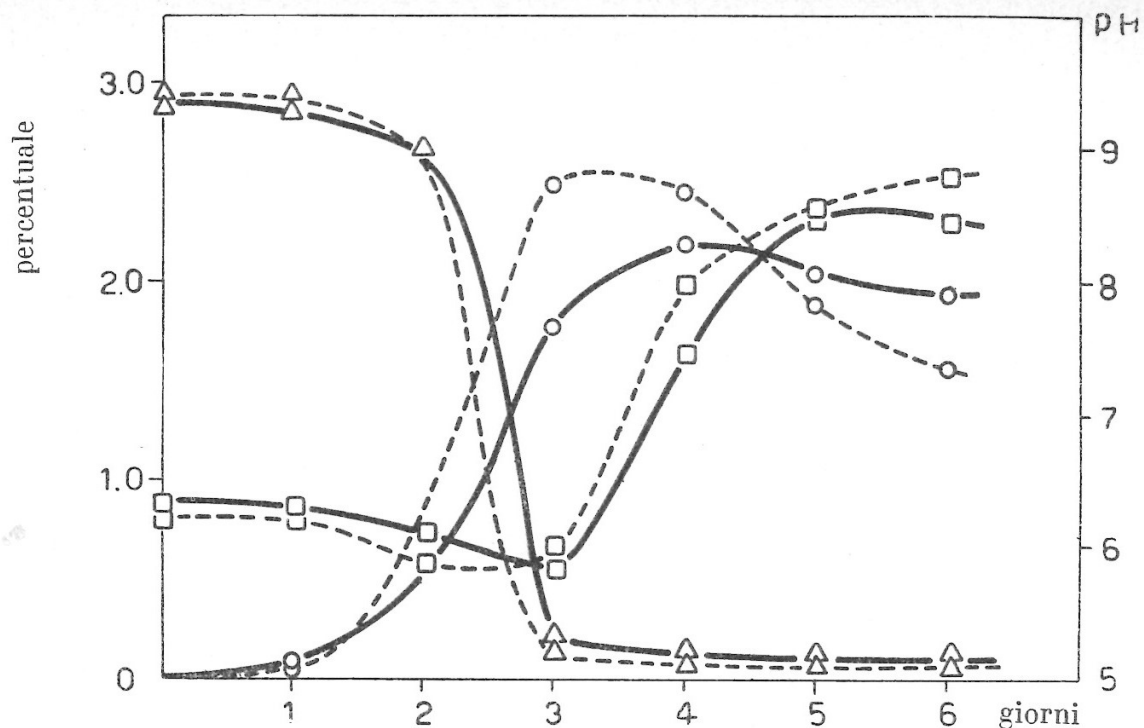


Fig. 1. - Andamento caratteristico delle fermentazioni in condizioni di agitazione intensa e blanda. Organismo: *Paecilomyces variati* Bainer.

a) agitazione intensa (elevata velocità di aerazione);

———— sistema a vortice, diametro delle pale dell'elica 90 mm, 730 giri al minuto, 1 atmosfera di sovrappressione;

----- sistema a vortice, diametro delle pale dell'elica 63 mm, 1430 giri al minuto; 0,5 atmosfere di sovrappressione;

b) agitazione blanda (bassa velocità di aerazione):

———— sistema a vortice, diametro delle pale dell'elica 63 mm, 730 giri al minuto, 0,6 atmosfere di sovrappressione;

----- sistema antivortice a diffusore, diametro delle pale dell'elica 75 mm, 360 giri al minuto, 0,5 atmosfere di sovrappressione.

□ pH

○ Glucosio

△ peso secco

L'autolisi, misurata da una caduta della percentuale di peso secco del micelio, si verificò soltanto in due funghi, il *Paecilomyces varioti* e il *Rhizopus* sp., agitando sia intensamente sia blandamente, benchè si potesse vedere all'esame microscopico che, per la maggior parte dei funghi, il micelio sviluppato in condizioni di agitazione intensa diventava vacuolato e incominciava a subire autolisi quando gli zuccheri erano esauriti. Questo fenomeno era meno evidente in condizioni di agitazione blanda.

Furono fatte alcune misure della lunghezza delle ife al momento del massimo peso secco, immediatamente dopo l'esaurimento del glucosio. Questo si verificò tra 72 e 96 ore nella maggior parte dei casi, ma prima con funghi a sviluppo rapido come l'*Aspergillus niger* ed il *Rhizopus*. Questi valori sono riportati nella Tabella 2 e vanno presi come semplici

Valutazione delle lunghezze di unità di ife

TABELLA 2

Fungo	Età ore	L u n g h e z z a d e l l e u n i t à			
		750 giri/min. diam. 90 mm	1450 giri/min. diam. 65 mm	750 giri/min. diam. 65 mm	360 giri/min. diam. 75 mm
A. niger	66	130 μ	130 μ	300 μ	370 μ
A. fumigatus	96	150 μ	158 μ	400 μ	400 μ
A. glaucus	96	160 μ	160 μ	225 μ	315 μ
P. varioti	72	160 μ	130 μ	270 μ	305 μ
S. atra	96	350 μ		350 μ	370 μ
C. herbarum	96	100 μ	250 μ	205 μ	—

valutazioni, dato che nel caso di ife lunghe risultò impossibile misurare con precisione la lunghezza, e che in seguito ad aggrovigliamento in ogni campione poterono essere misurate solo le ife libere che tendevano ad essere le più corte.

OSSERVAZIONI MORFOLOGICHE SUI SINGOLI FUNGHI.

1) *Aspergillus fumigatus* (Figure 2a e b).

L'effetto dell'agitazione meccanica su questo fungo era simile a quello già descritto per il *Penicillium chrysogenum* ⁽¹⁾. In condizioni di

agitazione intensa le ife erano più corte e ramificate che non con agitazione blanda, e le singole cellule nelle ife erano accorciate. E' tuttavia evidente che nei fermentatori sottoposti ad agitazione intensa si ebbe in misura considerevole danno meccanico in quanto le ife erano spezzate e presentavano molte pareti cellulari vuote (Figura 2a). Si rilevò anche un ritardo di circa 24 ore nella crescita di queste colture; queste tuttavia, una volta avviate, si svilupparono più rapidamente di quelle che erano state fatte crescere in condizioni di agitazione blanda.

2) *Aspergillus niger* (figure 3a e b).

Questo fungo si sviluppò molto rapidamente, ed esaurì praticamente tutto il glucosio dopo 48 ore, nei fermentatori bene aerati. Il micelio adottò la forma tipica delle colture bene agitate, differendo da quella dell'*A. fumigatus* per il fatto che le unità corte ramificate presentavano pochi eventuali segni di danno meccanico fino a che il glucosio non fosse stato esaurito, dopo di che incominciavano a frantumarsi.

Quando l'agitazione era blanda, specialmente nel sistema antivortice, fu interessante notare che le ife, benchè lunghe, contenevano cellule viventi soltanto alle estremità mentre la loro parte restante consisteva in pareti cellulari vuote (figura 3b). Ciò è probabilmente dovuto ad una carenza di ossigeno.

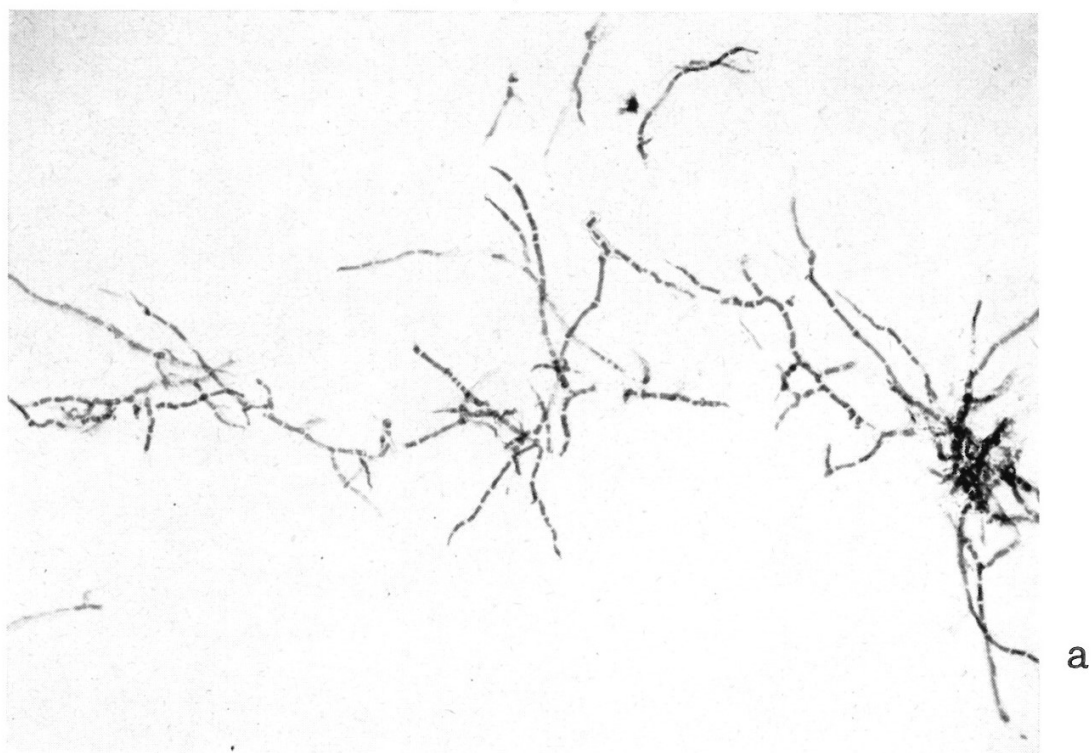
I fermentatori bene aerati produssero grandi quantità di acido (che si dimostrò non essere acido citrico), in quanto il pH calò a 2,3 mentre non fu prodotta quantità apprezzabile di acido dalle colture con basse velocità di aerazione.

3) *Aspergillus glaucus* (figure 4a e b).

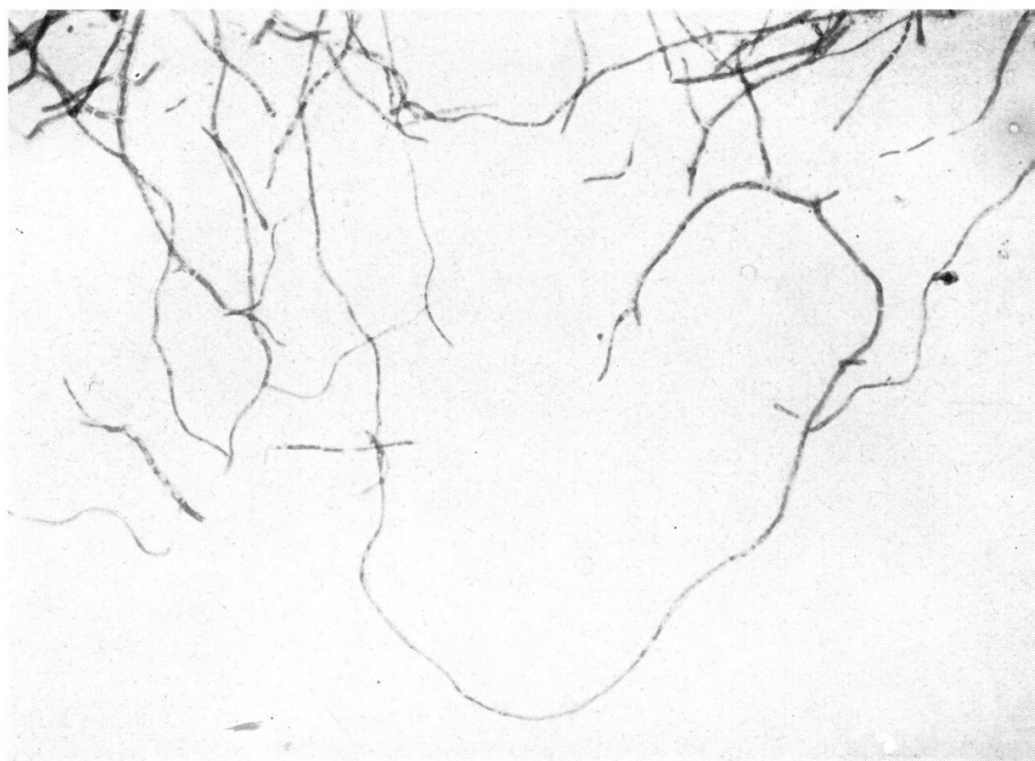
Le sospensioni di spore di questo fungo avevano una densità piuttosto bassa, e di conseguenza il micelio aveva tendenza a svilupparsi nella forma di palette, specialmente nel sistema antivortice. Con agitazione intensa queste palette furono ridotte a piccoli ammassi di ife ed alle normali ife libere ramificate corte, mentre in condizioni di agitazione blanda quasi tutto il micelio era costituito da palette fiocose soffici con ife periferiche lunghe, a guisa di coda.

Nei due tipi di agitazione si formarono abbondanti conidiofore, i cui sterigmati si sviluppavano spesso direttamente in nuove ife senza produrre conidi. Queste anomalie erano maggiormente pronunciate con agitazione blanda che con una intensa, dove l'eccessivo sviluppo delle conidiofore era impedito da forze meccaniche.

Fig. 2-II - x 200. Fotografie del micelio di differenti funghi in condizioni di agitazione intensa e blanda. In ciascuna pagina la fotografia superiore (a) mostra il micelio dei fermentatori ad intensa agitazione. (Per le condizioni vedasi la leggenda alla fig. 1, a meno che non sia altrimenti specificato). La fotografia inferiore di ciascuna pagina (b) mostra il micelio di fermentatori a blanda agitazione. (Per le condizioni vedasi la leggenda alla fig. 1, a meno che non sia altrimenti specificato).

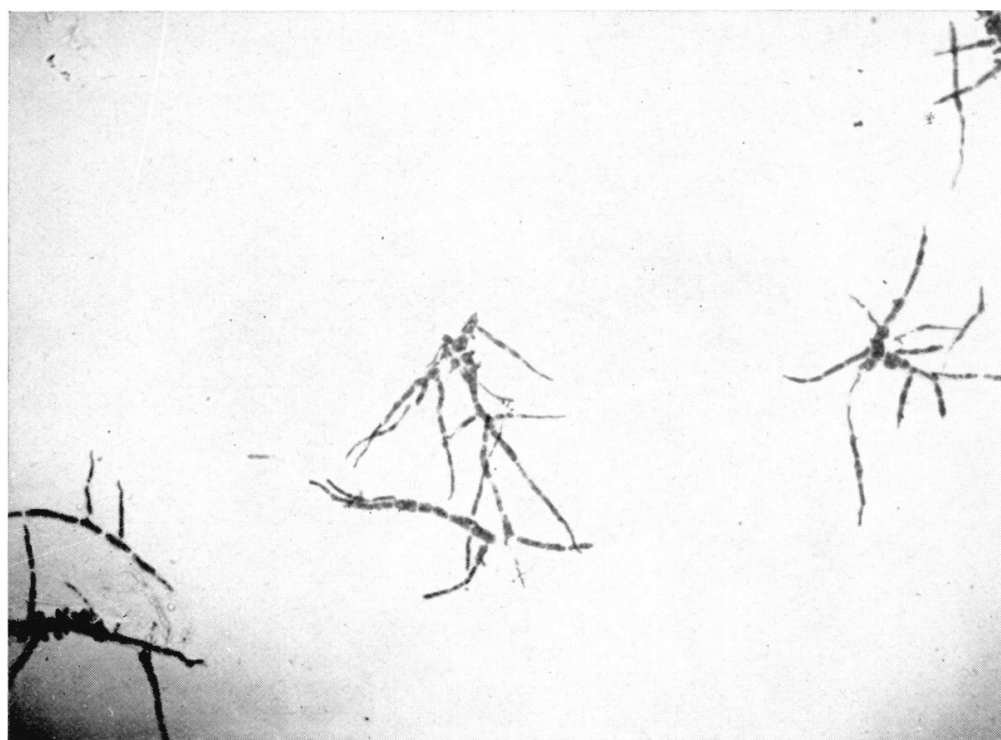


a



b

Fig. 2 a e b - *Aspergillus fumigatus* (96 ore).

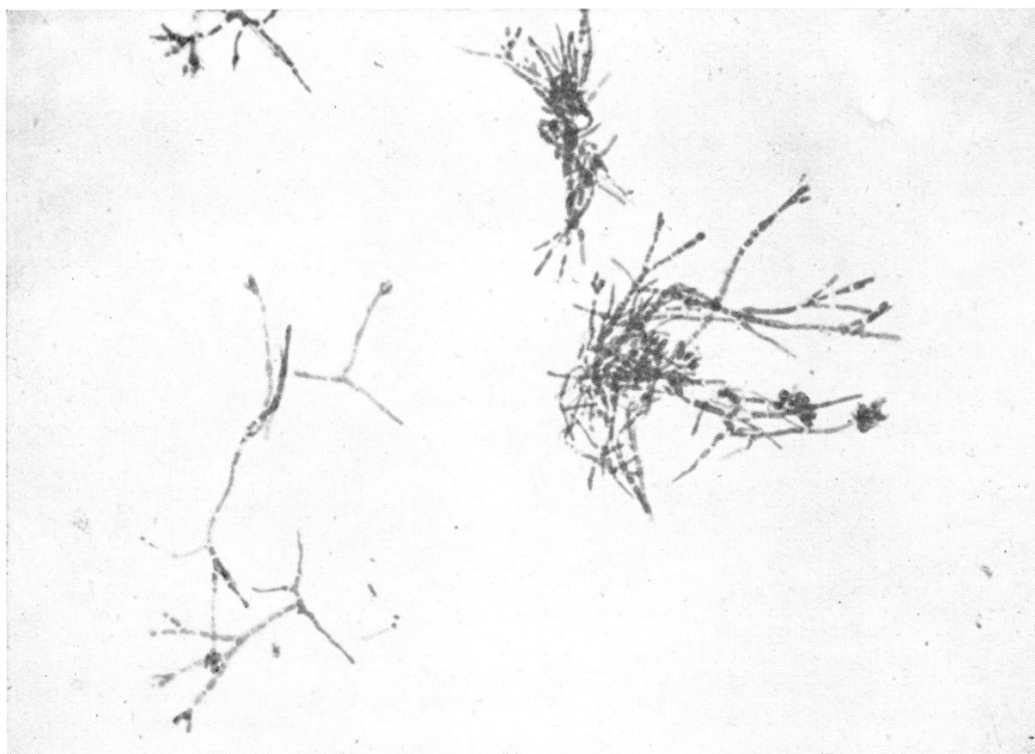


a

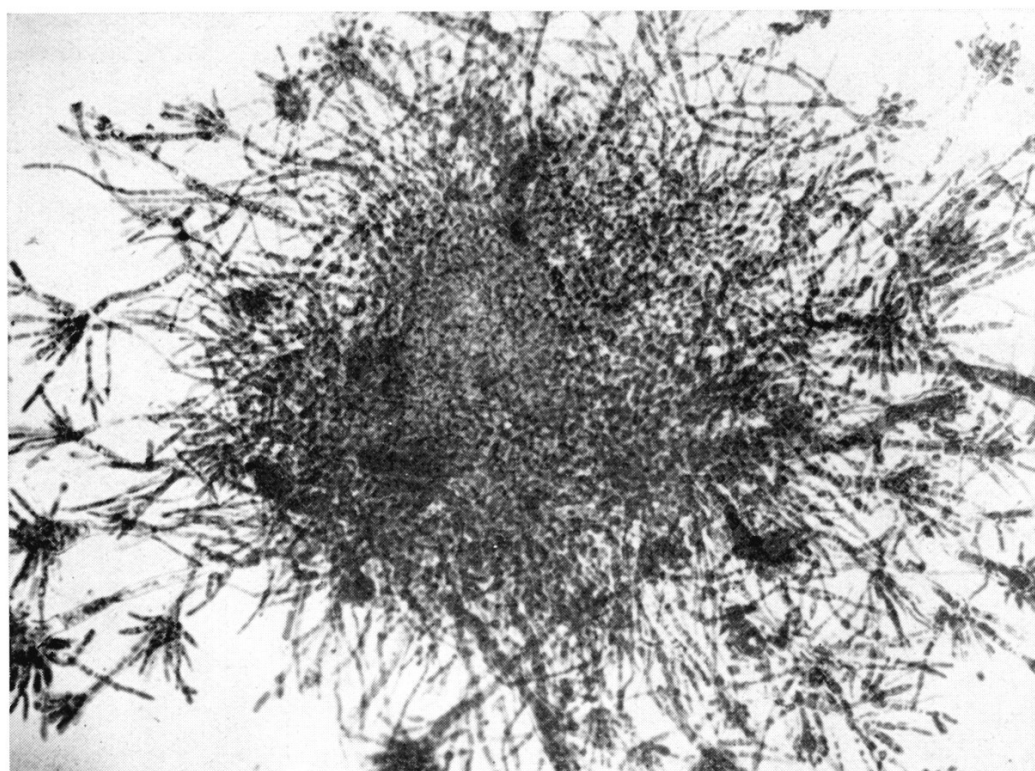


b

Fig. 3 a e b - *Aspergillus niger* (66 ore) (a: $\varnothing$ delle pale dell'elica 90 mm).



a



b

Fig. 4 a e b - *Aspergillus glaucus* (96 ore).

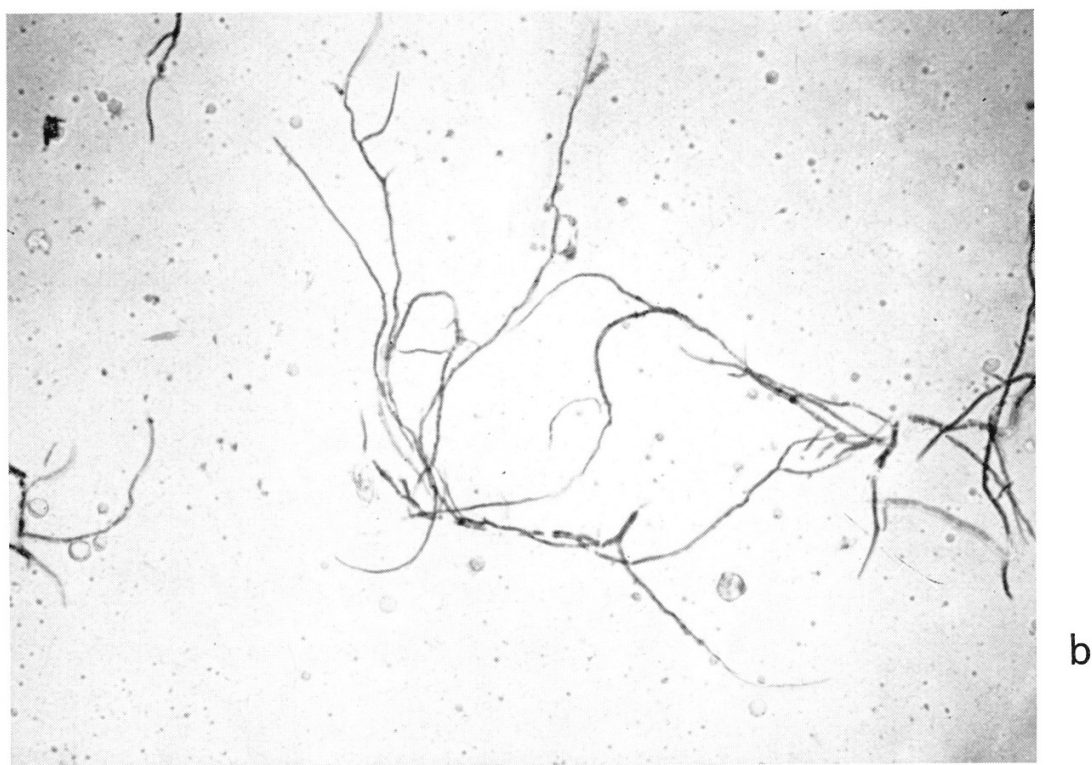
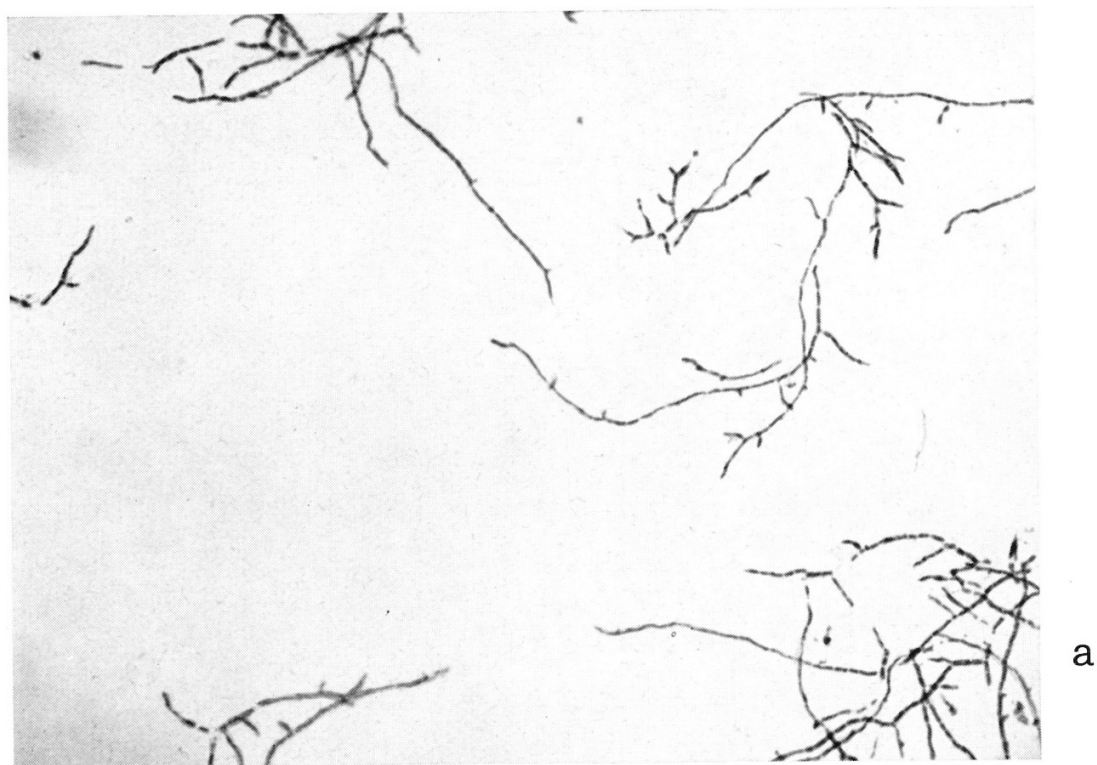
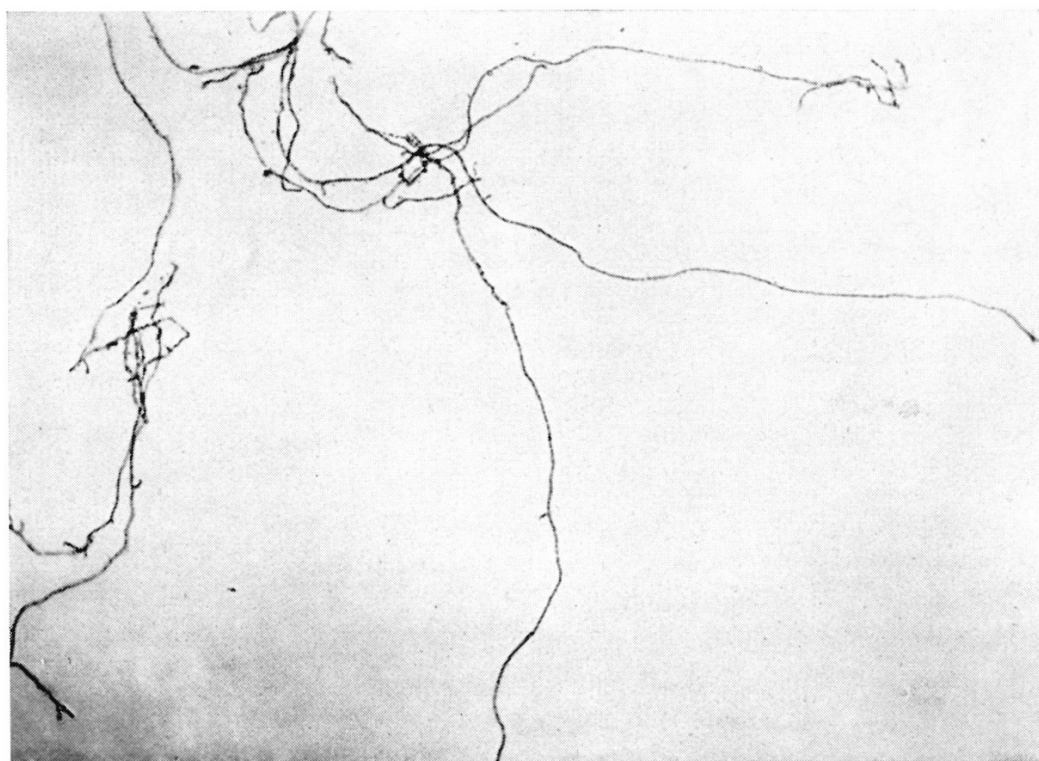
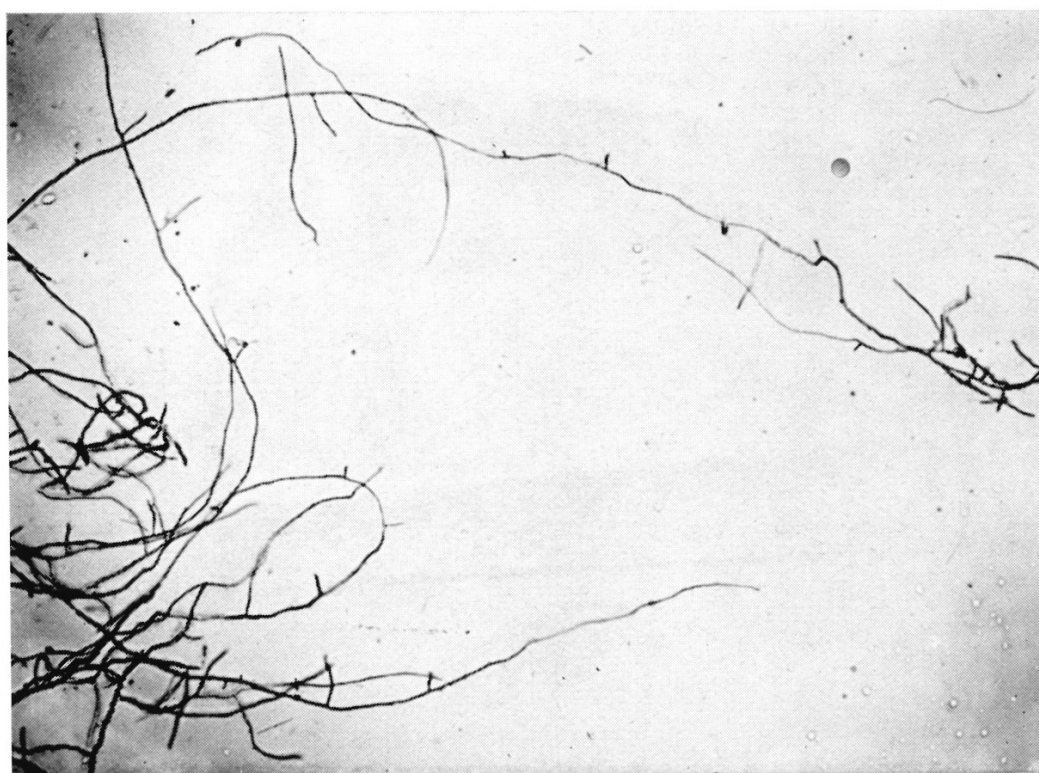


Fig. 5 a e b - *Paecilomyces varioti* (72 ore).

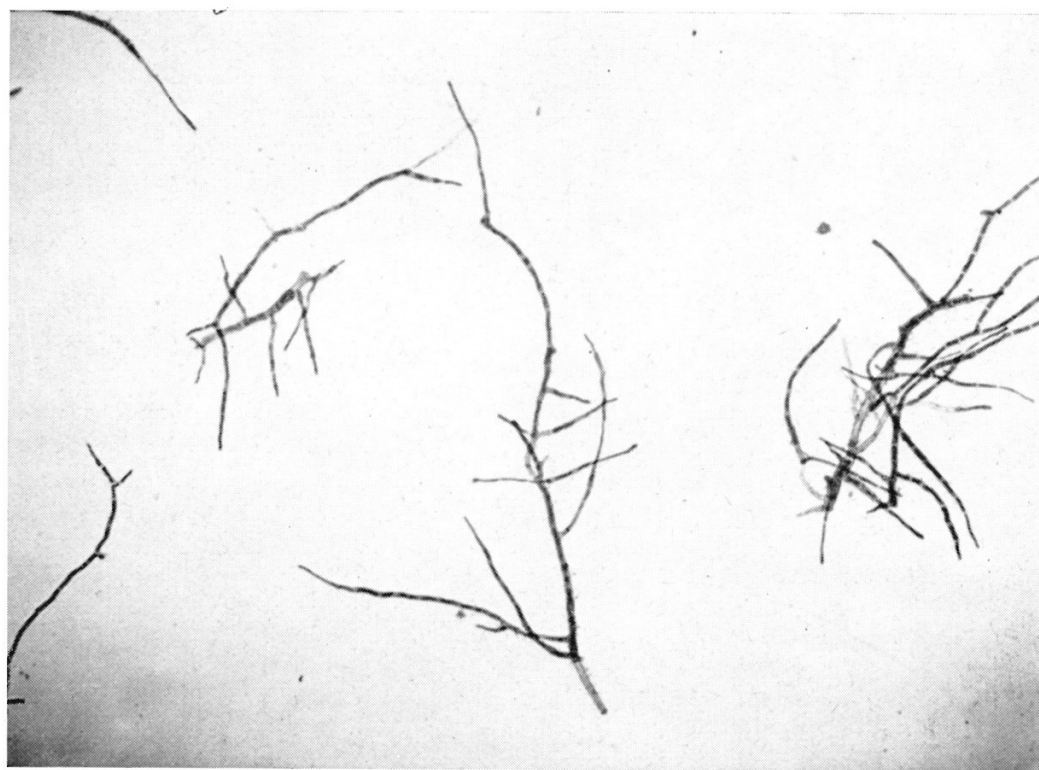


a

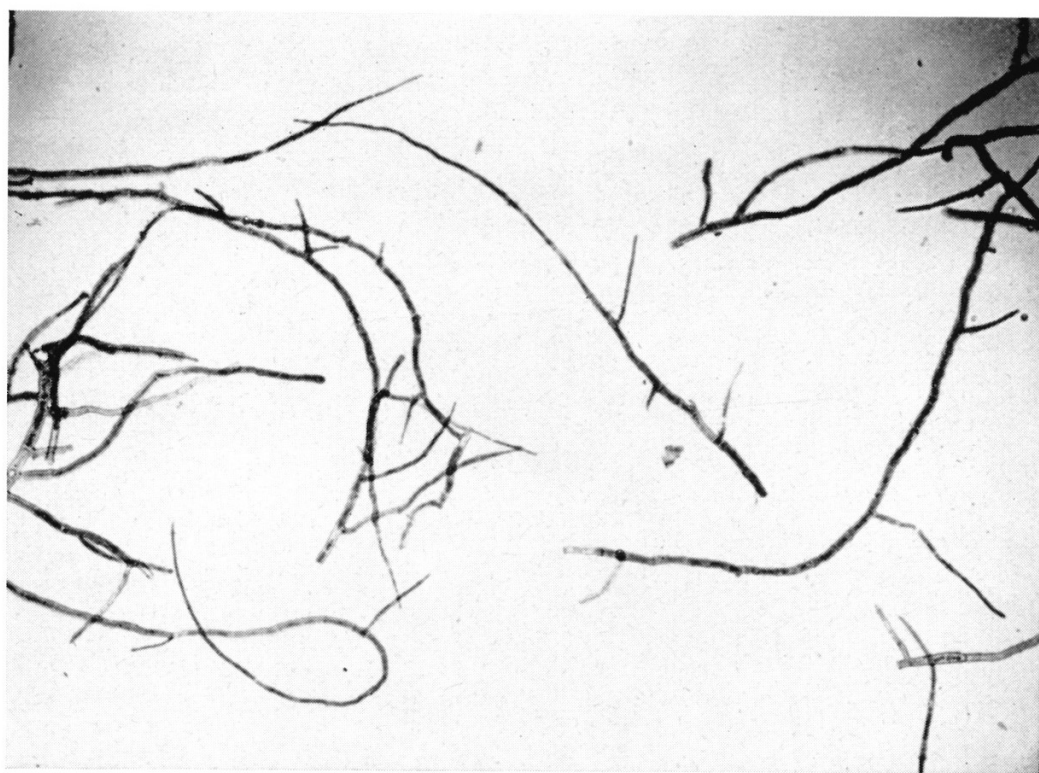


b

Fig. 6 a e b - *Stachybotrys atra* (96 ore).

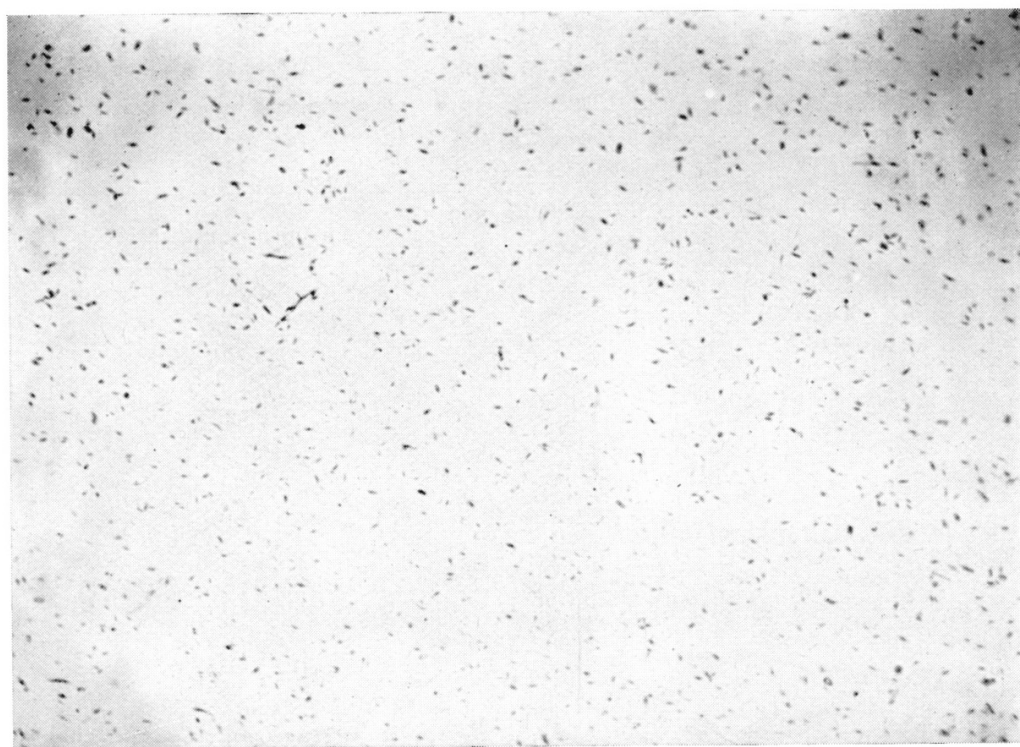


a



b

Fig. 7 a e b - *Cephalosporium acremonium* (89 ore)

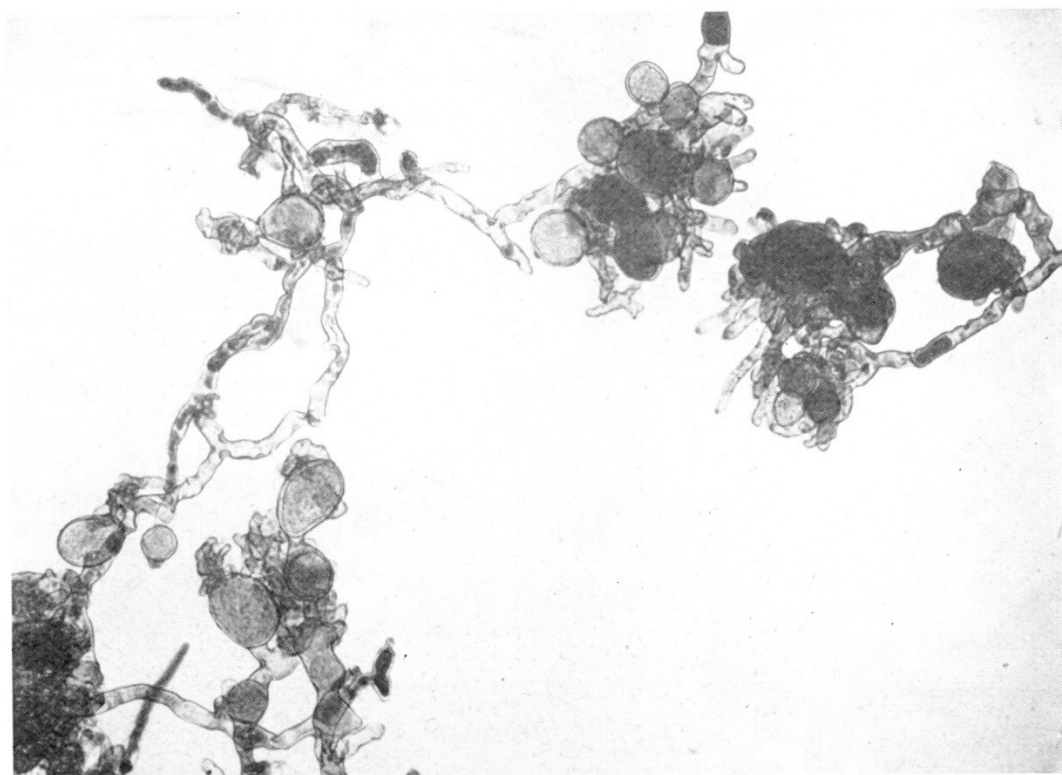


a

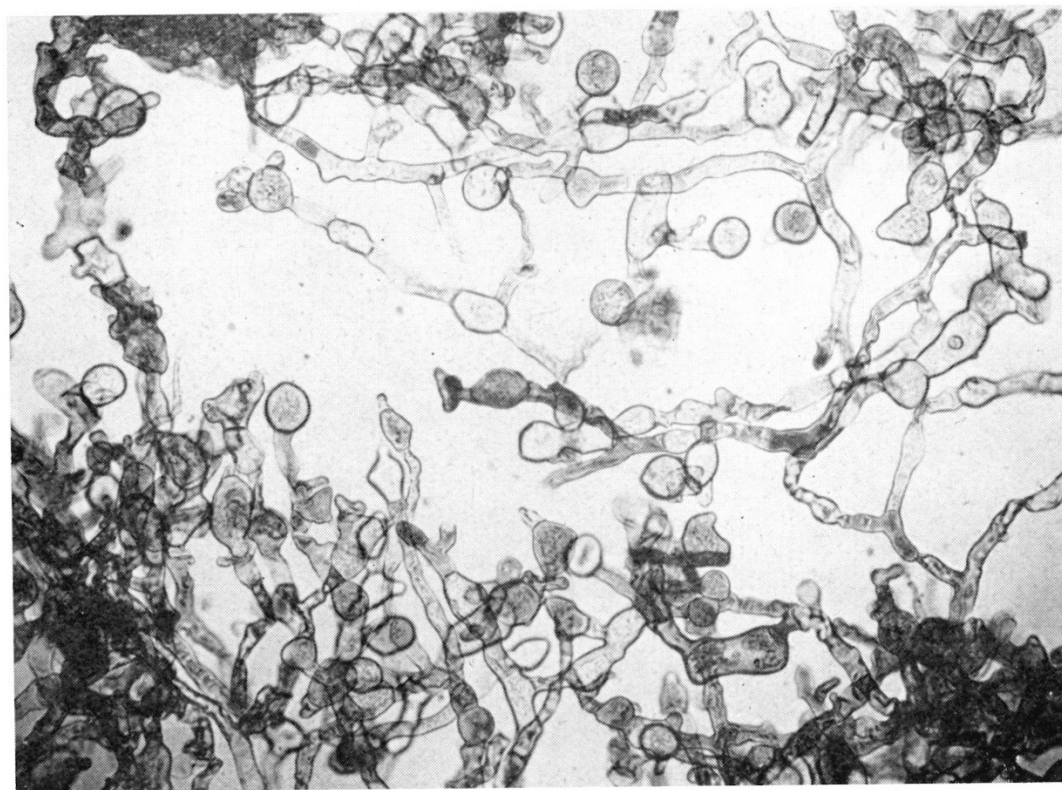


b

Fig. 8 a e b - *Cladosporium herbarum* (96 ore).

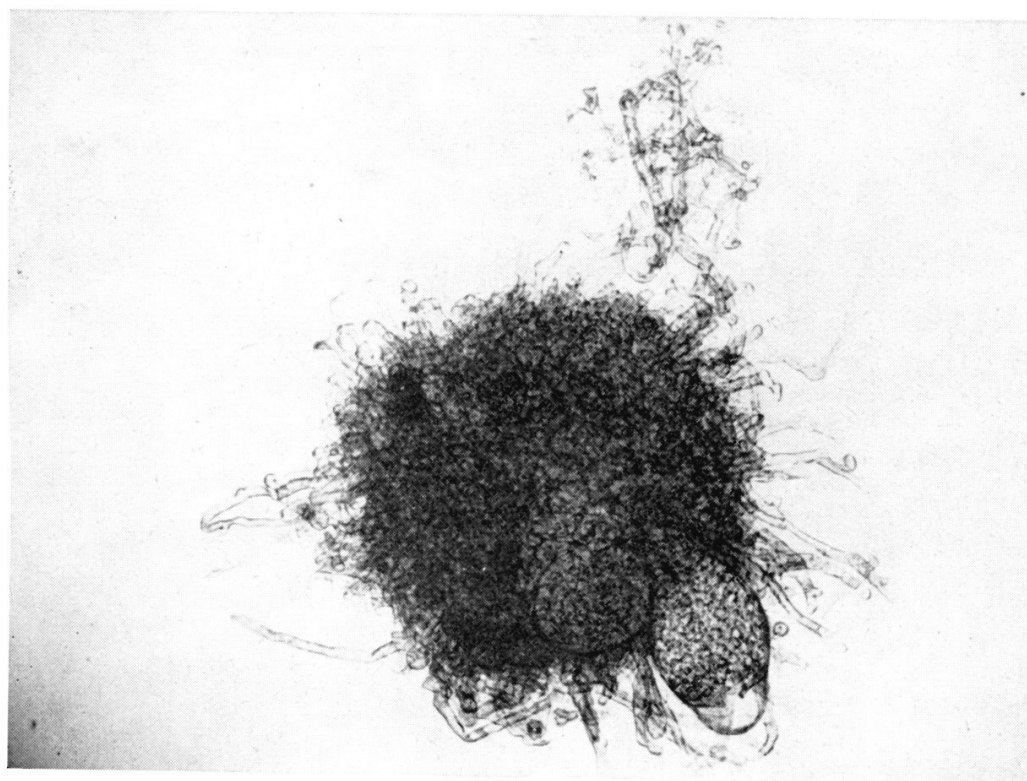


a

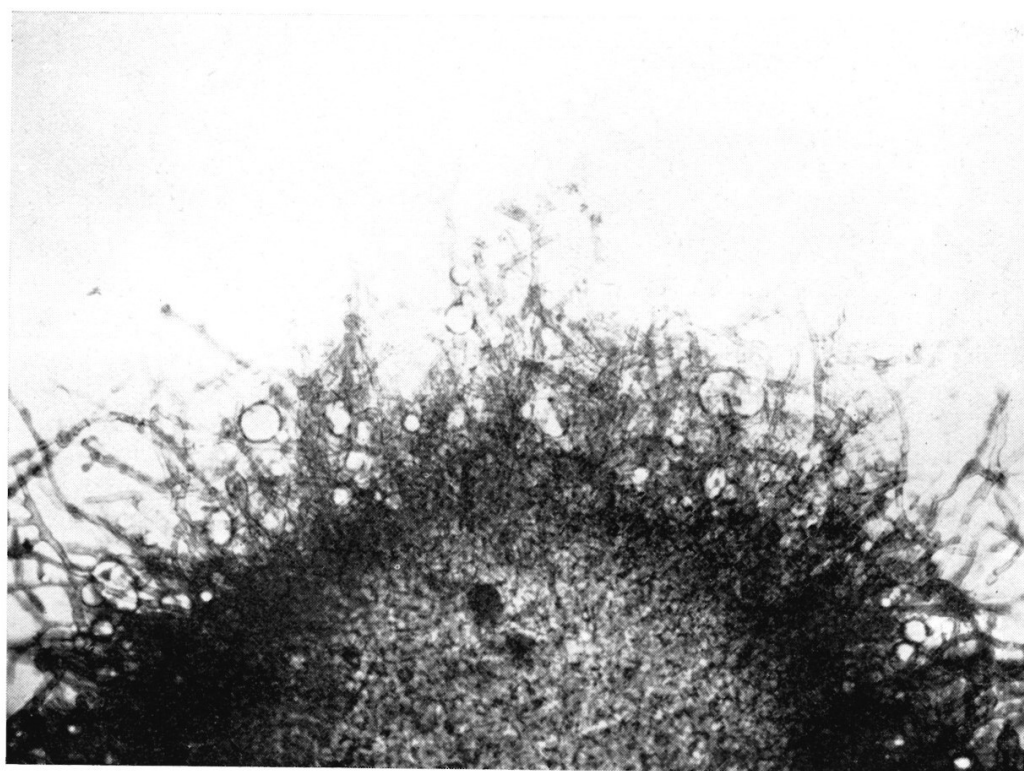


b

Fig. 9 a e b - *Rhizopus* sp. (66 ore).

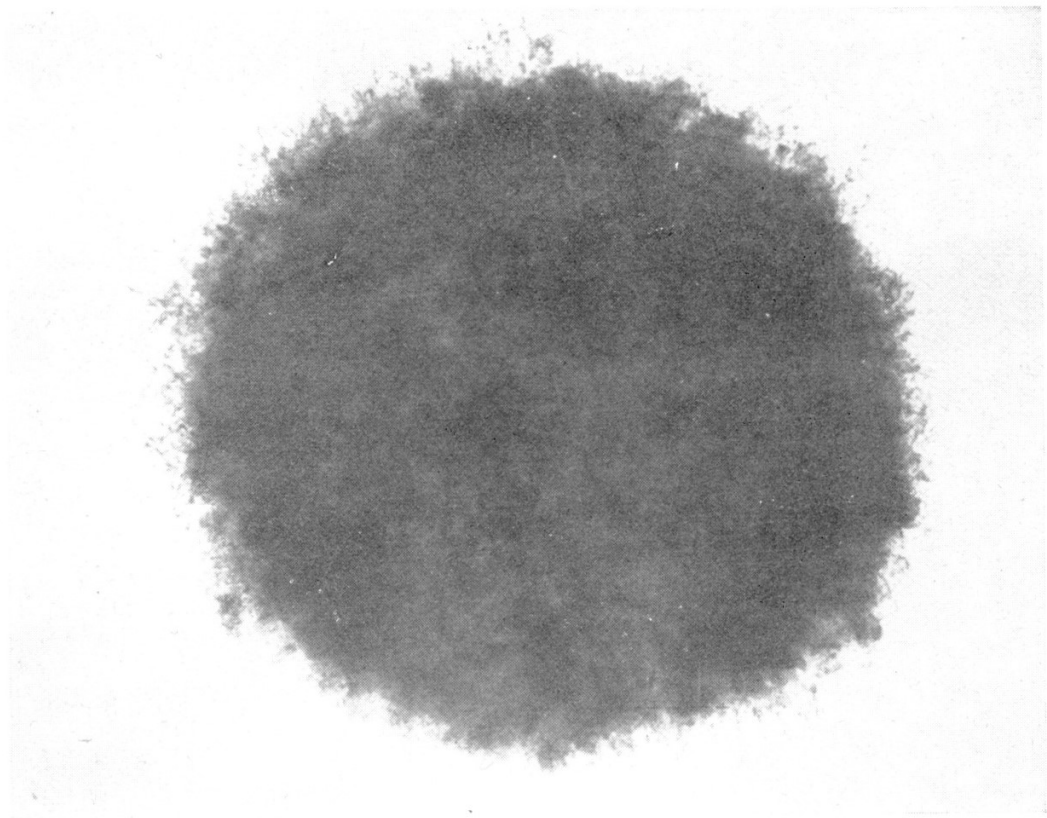


a

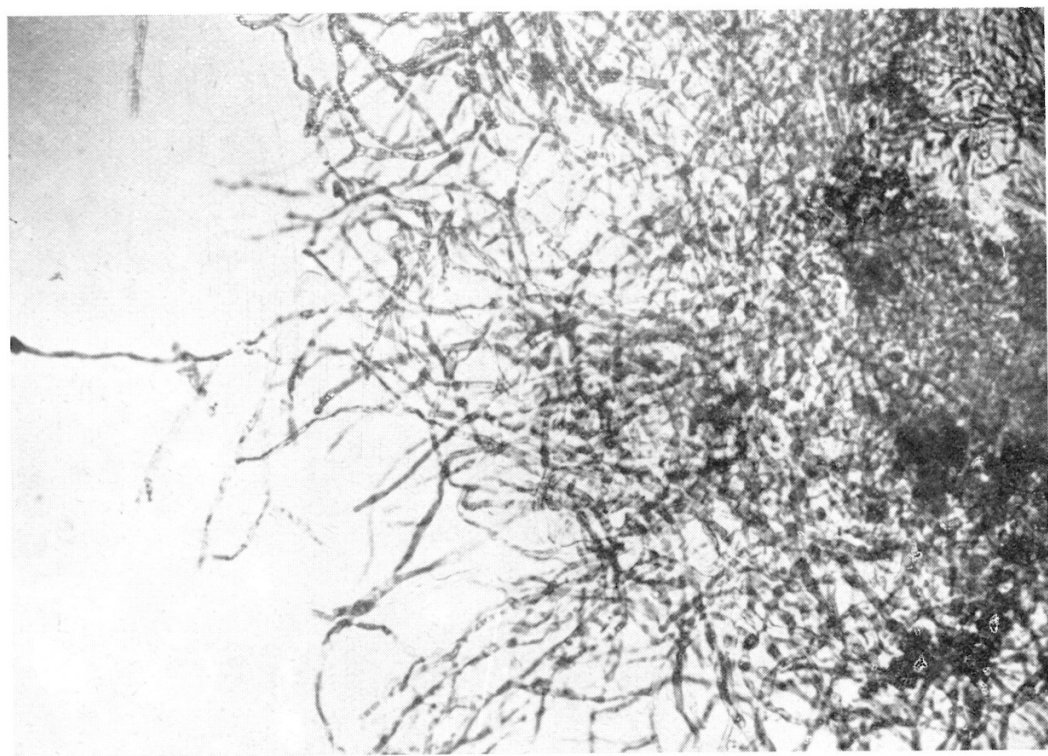


b

Fig. 10 a e b - *Mucor sp.* (161 ore) (a: $\varnothing$ delle pale dell'elica 90 mm; b: sistema ad antivortice e a diffusore).



a



b

Fig. 11 a e b - *Hasplosporangium sp.* (120 ore) (b: sistema ad antivortice e a diffusore).

4) *Paecilomyces varioti* (figure 5a e b).

Questo fungo rispose in maniera analoga al *Penicillium chrysogenum* agli effetti dell'agitazione meccanica. Una agitazione intensa diede come risultato un micelio ramificato accorciato che produsse abbondanti conidî dopo due giorni. In condizioni di agitazione blanda le ife rimasero lunghe e filamentose e non produssero conidî.

Tranne nel caso dei fermentatori antivortice, si notò un netto calo del peso secco del micelio non appena gli zuccheri furono esauriti (figura 1). Le ife si vuotarono e disintegrarono nei fermentatori impiegando il sistema di aerazione a vortice, ma rimasero in buone condizioni nei fermentatori antivortice fino alla fine della fermentazione.

5) *Stachybotrys atra* (figure 6a e b).

Questo fungo era interessante in quanto non sembrava che l'agitazione avesse alcuno effetto sulla forma del micelio. In tutti i fermentatori le ife erano fini e lunghe. Non si produsse alcuna spora nè fu osservato alcun segno di autolisi; il micelio rimase infatti in eccellenti condizioni per diversi giorni dopo esaurimento degli zuccheri. Vi fu una tendenza alla formazione di pallette in tutti i fermentatori; quelle formate nelle colture bene agitate erano piccolissime e molto compatte mentre con una agitazione blanda si ebbero pallette più numerose e più grandi.

6) *Cladosporium herbarum* (figure 7a e b).

Le ife di questo fungo apparvero molto facilmente frantumabili mediante agitazione meccanica. Anche con una bassa velocità di agitazione, le ife presentarono continuamente fratture e ramificazioni laterali danneggiate, in maniera non osservata con altri funghi. Nonostante ciò, tuttavia, l'utilizzazione del glucosio fu rapida ed il peso secco crebbe costantemente. In un esperimento lo sviluppo risultò molto migliore nei fermentatori con agitazione blanda, applicando il sistema a vortice, ma in un esperimento successivo i fermentatori sottoposti ad agitazione intensa diedero uno sviluppo migliore.

Le ife di *Cladosporium* mostrarono una certa differenziazione, in quanto le unità consistevano in una ifa principale piuttosto spessa, con un apice rastremato e un estremo distale che era normalmente spezzato, e ife laterali molto più fini e più flessuose.

7) *Cephalosporium acremonium* (Figure 8a e b).

Variazioni nell'intensità dell'agitazione meccanica ebbero scarso effetto sullo sviluppo di questo fungo. Tranne nel caso dei fermentatori an-

tivortice, tutte le colture utilizzarono glucosio alla stessa velocità e mostrarono aumenti analoghi del peso secco. Quando il glucosio fu esaurito, si ebbe un calo immediato nel peso secco. Dopo il primo giorno le colture erano costituite quasi interamente da masse di conidi rosa. Nei fermentatori aerati mediante il sistema a vortice era visibile pochissimo micelio e in tutti i casi le ife erano corte e finissime. Nei fermentatori antivortice aerati mediante un diffusore di aria le ife erano più lunghe, ma anche queste colture consistevano quasi interamente in conidi. Questo tipo di sviluppo è anche caratteristico delle colture sviluppate in bente agitate, e sembrò che l'agitazione meccanica non avesse alcun effetto sullo sviluppo di questo fungo.

8) *Rhizopus* sp. (figure 9a e b).

Questo fungo si sviluppò con estrema rapidità, e, come nel caso dell'*A. niger*, crebbe oltre i diffusori ed i tubi presa di campione nei fermentatori antivortice.

Nella coltura sviluppata con intensa agitazione, le ife erano molto irregolari e distorte, producendo ammassi di ife digitiformi a partire dalle cellule terminali ed abbondanti clamidospore di diametro variabile da 15 a 30 micron. Con l'invecchiamento di queste colture si formava un numero considerevole di piccole palette compatte che sembravano aver avuto origine dagli ammassi di ife formati dalle cellule delle ife terminali. Il peso secco massimo in queste ultime si manifestò dopo circa 66 ore, ed in seguito subentrò l'autolisi.

Nei fermentatori muniti del sistema a vortice e provvisti di agitazione blanda lo sviluppo fu meno distorto e il micelio raggiunse un peso secco più elevato che negli altri fermentatori. Si formarono anche qui numerose clamidospore che tuttavia erano più piccole, avendo generalmente un diametro da circa 15 a 20 micron. Benchè le ife manifestassero una tendenza a svilupparsi in ammassi aggrovigliati, non furono visibili le palette bene organizzate che si formarono con l'agitazione intensa.

Nei fermentatori antivortice le ife erano lunghe e regolari e non si formarono clamidospore, ma poichè il passaggio dell'aria era bloccato e l'elica era ricoperta di micelio, questi fermentatori furono scartati.

9) *Mucor* sp. (figure 10a e b).

Fu osservato con il *Rhizopus* che le colture sviluppate con agitazione intensa mostravano un deciso mutamento dal tipo di crescita filamentoso a quello a palette. Anche nei primi stadi, il *Mucor* e l'*Haplosporangium* furono incapaci di svilupparsi in una forma filamentosa e nei

due funghi il micelio si presentò sempre in forma di palette, nelle colture bene agitate. Talvolta nelle colture vecchie alcune delle ife periferiche furono staccate e si dimostrarono capaci di sopravvivere.

Le ife erano molto ramificate, dotate di larghezza irregolare e di aspetto distorto in condizione di agitazione intensa. Erano dapprima non settate ma sviluppavano setti in colture più vecchie, specialmente quando le ife diventavano prive delle palette. Dopo circa 72 ore di sviluppo, emersero dalle palette ife rigonfie a forma di clava, larghe talvolta fino ad 80 micron. Contenevano molti globuli di olio ed un denso protoplasma granulare, ed erano generalmente in numero non maggiore di due o tre per ciascuna palette (figura 10a). Rimasero fuoriuscenti dalle palette e non si svilupparono ulteriormente.

In condizioni di agitazione blanda, il micelio era composto di un miscuglio di palette e di ife filamentose, ma in questi casi le palette erano più grandi, a struttura fioccosa sciolta con lunghe ife periferiche a guisa di coda. Le ife erano più regolari e meno ramificate, e le ife claviformi ingrandite comparivano molto più tardi nella fermentazione ed erano in minor numero.

La differenza di struttura delle palette formate con agitazione intensa e di quelle formate con agitazione blanda era molto netta, le prime essendo piccole, di un diametro di circa 230 micron, compatte e dure, con appena qualche eventuale ifa periferica sporgente, mentre le seconde avevano un diametro maggiore di oltre 100 micron ed erano soffici e disposte in maniera non compatta con una frangia circostante di ife filamentose. Si otteneva tuttavia sempre una maggior produzione di micelio nei fermentatori bene agitati.

10) *Haplosporangium* sp. (Figure 11a e b).

La crescita di *Haplosporangium* era molto simile a quella del *Mucor*: infatti si formavano palette compatte piccole nelle colture in condizioni di agitazione intensa, mentre si formavano palette soffici più grandi nelle colture in condizioni di agitazione blanda. La differenza di grandezza era anche più netta che nel *Mucor*, e per i primi due giorni non si ebbe affatto sviluppo nei fermentatori intensamente agitati. Dopo questo ritardo iniziale, tuttavia la crescita fu rapida, benchè la miglior produzione di micelio si verificasse nel sistema a vortice con agitazione blanda.

DISCUSSIONE

Dei sette funghi settati, esaminati in questo studio, le tre specie di *Aspergillus* e di *P. varioti* reagirono in maniera analoga al *P. chrysogenum* agli effetti della agitazione meccanica. Vale a dire che, con una agitazione intensa, le ife diventavano corte e ramificate con proporzioni variabili di cellule vuote e autolisanti. Con agitazione blanda, le ife rimanevano lunghe e mostravano generalmente pochissima autolisi. Contrastavano con questo gruppo di funghi lo *Stachybotrys* e il *Cephalosporium acremonium* sulla crescita dei quali la agitazione meccanica ebbe scarso effetto; infatti il micelio si sviluppava in maniera analoga a quello fatto crescere in beute agitate. Sembrava che il *Cladosporium herbarum* occupasse una posizione intermedia tra questi due gruppi. Per quanto avesse una tendenza a crescere nella forma filamentosa lunga, appariva particolarmente sensibile all'effetto dell'attrito meccanico delle pale dell'elica, sotto le quali era ridotto in frammenti. La frantumazione dovuta all'effetto dell'agitazione meccanica non fu osservata in misura così marcata in nessuno degli altri funghi esaminati. Questo fenomeno può forse essere spiegato con la grandezza delle ife di *Cladosporium herbarum* che sono molto larghe (tra 4 a 6 micron) per cui sarebbero suscettibili di rompersi più facilmente di quelle, per esempio, dello *Stachybotrys atra* che sono larghe solo da 1,5 a 2 micron. Un altro tipo ancora di risposta all'agitazione meccanica fu presentato dai Phycomycetes. Questi funghi mostrarono una tendenza a svilupparsi in forma di palette in tutti i fermentatori, ma più marcatamente in condizioni di agitazione intensa.

Si notarono in questi esperimenti due fattori che determinavano un tipo di crescita a colonia di palette. Il primo di questi, che è ben noto, è la grandezza dell'inoculo di spore; allorchè l'inoculo non era sufficientemente concentrato, come nel caso dell'*Aspergillus glaucus*, e, quando l'agitazione era blanda, le colture si sviluppavano sotto forma di una massa di palette spugnose. Con energica agitazione, tuttavia, queste palette non furono in grado di formarsi oppure furono frantumate, ed il micelio risultò essere composto da ife ramificate corte, caratteristiche delle colture bene agitate. Il secondo fattore che determinava la formazione di palette si manifesta nella crescita dei Phycomycetes *Mucor* e *Haplosporangium*. Qui si verifica la formazione di colonie compatte piccole nei fermentatori in condizioni di agitazione intensa. Può darsi che si tratti di una forma di autodifesa, e di un mezzo per impedire che le ife delicate non settate siano maciullate dall'elica. In questi funghi

la formazione di colonie era fortemente ridotta in condizioni di agitazione blanda; infatti una parte delle ife era in grado di sopravvivere in forma filamentosa, e nelle palette a struttura non compatta un numero molto maggiore di ife si trovò a contatto con il terreno che non nel tipo compatto duro, dove le palette erano spesso circondate da un involucro di ife vuote o autolisanti. Il *Rhizopus* era un tipo intermedio che produceva in un primo tempo un micelio filamentoso nelle colture bene agitate ma successivamente cresceva principalmente in forma di palette, mentre non si formavano affatto palette nelle colture sottoposte a scarsa agitazione.

Fu dimostrato molte volte che si otteneva la migliore produzione di micelio con colture bene aerate e ben agitate, probabilmente in seguito all'impiego più efficiente dei carboidrati per la sintesi dei materiali cellulari. Questo micelio tuttavia non era necessariamente nelle migliori condizioni per la produzione di materiali biologici, dato che era costituito da una proporzione variabile di ife vuote od autolisanti, a seconda della specie, oppure presentava un tipo inadatto di crescita a palette.

RINGRAZIAMENTI — Gli Autori desiderano ringraziare il Professor E. B. Chain, F.R.S., per aver suggerito questo lavoro, e per aver dato il suo continuo consiglio ed incoraggiamento.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) DION W. M., CARILLI A., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition), 17: 187 (1954).
 - (²) MOYER A. J. e COGHILL R. D. - J. Bacteriol., 51: 57 (1946).
 - (³) CHAIN E. B., PALADINO S., UGOLINI F., CALLOW D. S. e VAN DER SLUIS J. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition), 17: 61 (1954).
 - (⁴) COOPER C. M., FERNSTRONG G. A. e MILLER S. A. - Ind. Eng. Chem., 36: 504 (1944).
-