

44. Anna TESTI-CAMPOSANO. — Osservazioni morfologiche sulla crescita di *Aspergillus Flavus* in coltura sommersa. (*)

Riassunto. — 1) Vengono descritti i tipi morfologici di colonie di *Aspergillus flavus* in beute agitate.

2) I tre tipi di pallette che si formano sono denominati rispettivamente « f. l. » fioccoso, « h. s » vuoto liscio, « c. s. » compatto liscio; di questi il primo è quello che si incontra più frequentemente.

3) Tutti i tipi di pallette hanno una crescita zonata, cioè la crescita radiale di ife vegetative si alterna a quella di ife con cellule globose.

4) Le cellule globose differiscono dalle ife vegetative normali per il loro più alto contenuto in materiale amido-simile, la loro incapacità nell'ossidazione di glucosio ad acido kojico e la loro resistenza al calore.

Summary. — 1) The morphological forms of *A. flavus* (Link), appearing in shake flask cultures, are described.

2) Three types of pellets, termed « fluffy », the « hollow-smoots » and the « compact-smooth », respectively, are formed, of which the first is the most frequently encountered.

3) All types of pellets show zoned growth, consisting of concentric rings of vegetative hyphae alternating with globose cells.

4) The globose cells differ from the normal vegetative hyphae in their larger content of starch-like material, their inability to oxidise glucose to kojic acid, and their heat resistance.

Durante gli esperimenti effettuati per studiare l'influenza dell'agitazione meccanica nei fermentatori di acciaio inossidabile sulle colture

(*) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 448 (1959).

sommerse di *Aspergillus flavus* (Link), fu notato che anche nelle beute il micelio si organizzava in forme diverse. Esse sono state oggetto di studio nel presente lavoro.

METODI E MATERIALI

Il materiale e i metodi, per quanto si riferisce al ceppo, al terreno di coltura, alle condizioni di fermentazione, furono gli stessi usati nel precedente lavoro (1).

Gli studi morfologici furono estesi con osservazioni effettuate su sezioni istologiche di 5-10 μ di colonie in palette, fissate con alcool incluse in paraffina e colorate con ematossilina eosina.

RISULTATI

DIMENSIONI E TIPI DI COLONIE.

I conidi di *Aspergillus flavus* cresciuti in beute poste su agitatore rotatorio, contenenti terreno sintetico di Kluyver e Perquin, si sviluppano formando palette sferoidali il cui diametro varia inversamente con la concentrazione per ml dei conidi inoculati. Ciò si è osservato anche in *Penicillium chrysogenum* (2), ma mentre in questo microrganismo un inoculo molto abbondante dà luogo alla formazione di micelio filamentoso non organizzato in palette, nel caso di *A. flavus* mai si forma micelio filamentoso, anche con i più abbondanti inoculi. (Tab. 1).

TABELLA 1

Dimensioni in mm delle palette miceliali a varie ore, in beute da 500 cm³ con 100 cm³ di terreno K.

n° spore/ml del terreno	48 h	72 h	95 h
4.000.000	0,35 - 0,8	0,7 - 0,9	0,7 - 1
1.000.000	0,60 - 1,0	0,7 - 1,2	1,0 - 1,5
150.000	0,80 - 1,5	1,0 - 2,0	2,0 - 2,5
20.000	2,0 - 2,8	3,0 - 3,5	3,3 - 4,8
95	2,5 - 3,5	3,7 - 6,5	4,0 - 7,0

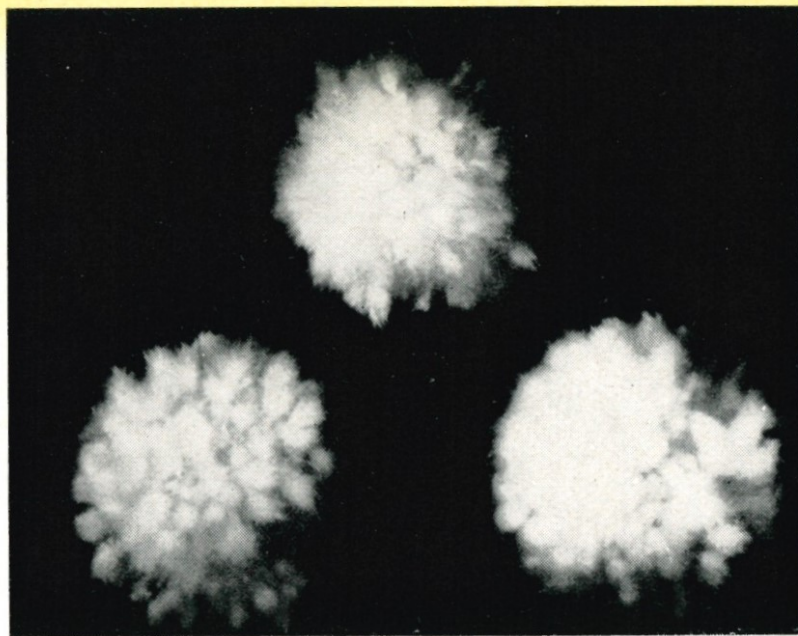
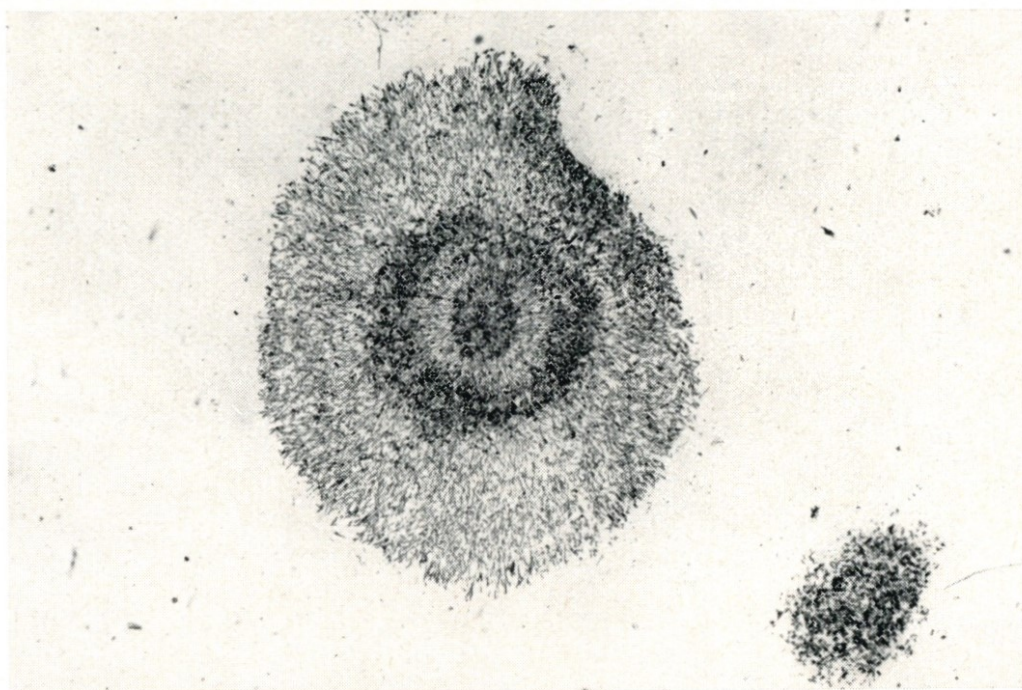


Fig. 1 - Pallette « composite » formate dalla confluenza di numerose colonie a piccole pallette.

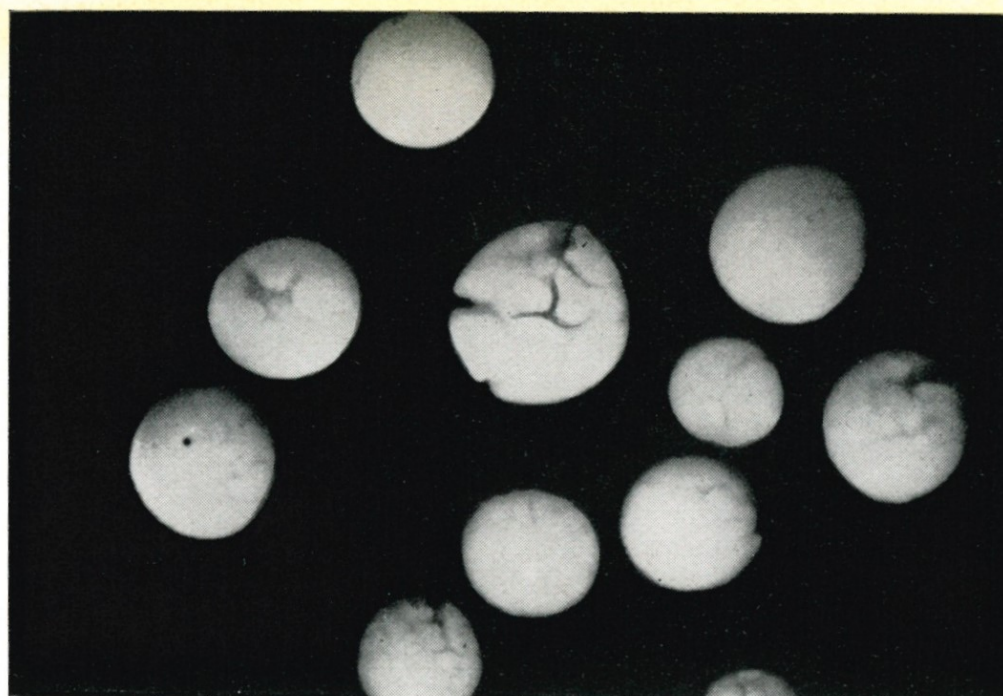


a

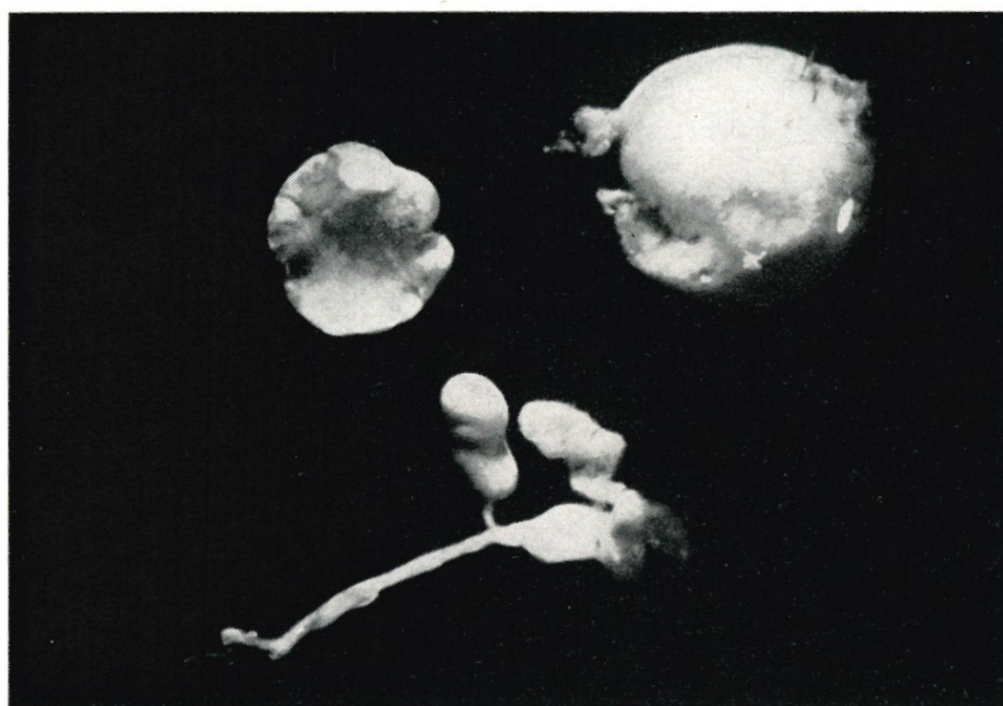


b

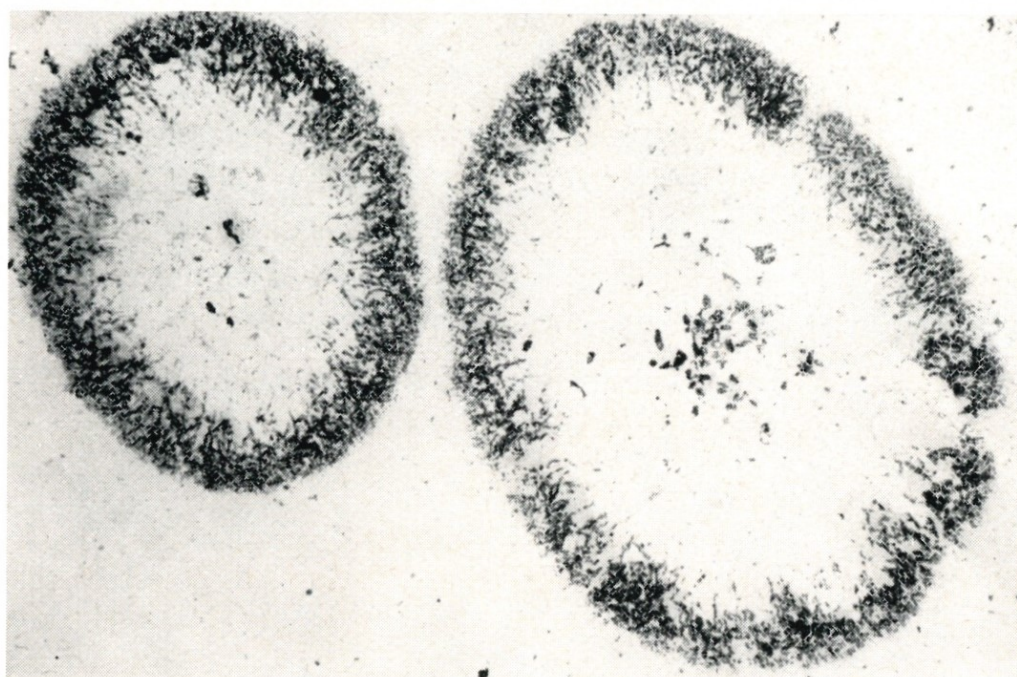
Fig. 2 - Pallette del tipo « fioccoso lasso »
a) aspetto macroscopico (x 6)
b) sezione istologica (x 20)



a



b



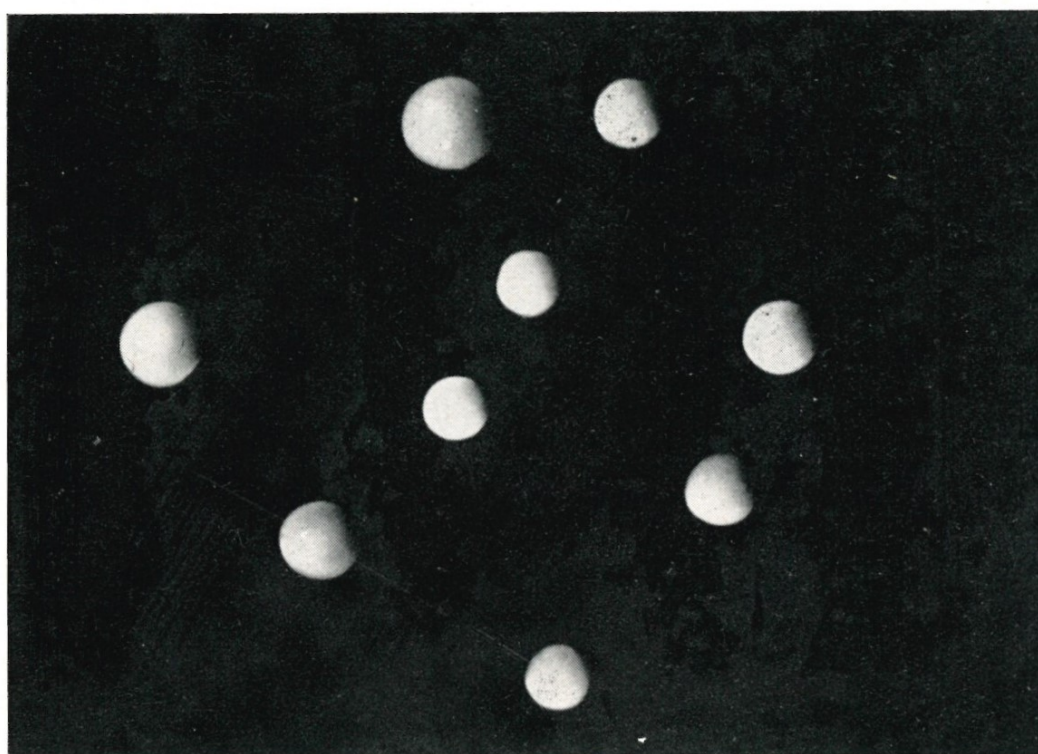
c

Fig. 3 - Pallette del tipo vuoto liscio

a) aspetto macroscopico (x 6)

b) aspetto macroscopico di pallette lacerate (x 6) in cui è visibile l'interno vuoto.

c) sezione istologica delle stesse mostrandone l'interno vuoto, autolisato (x 20)

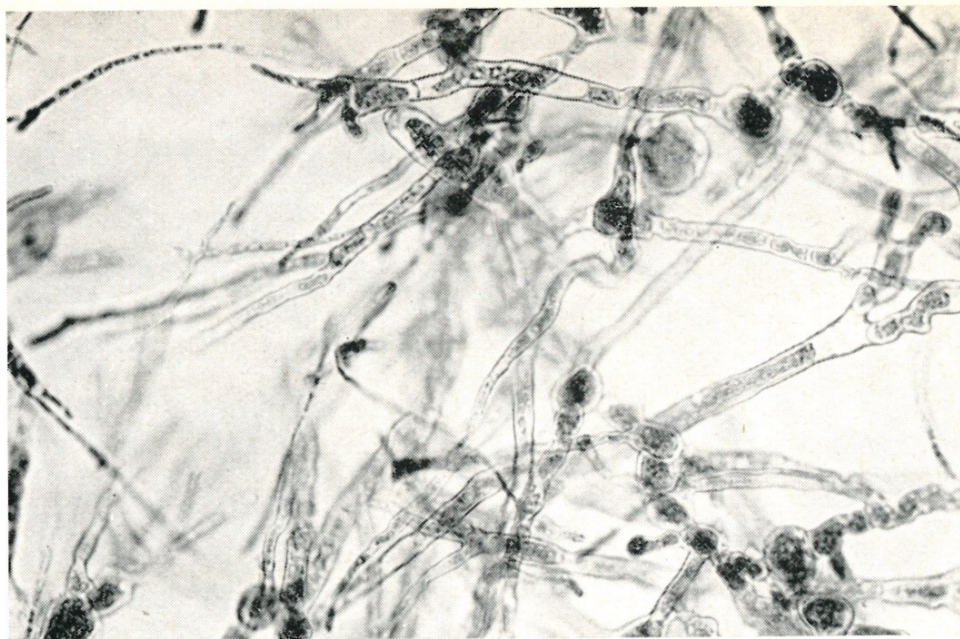


a

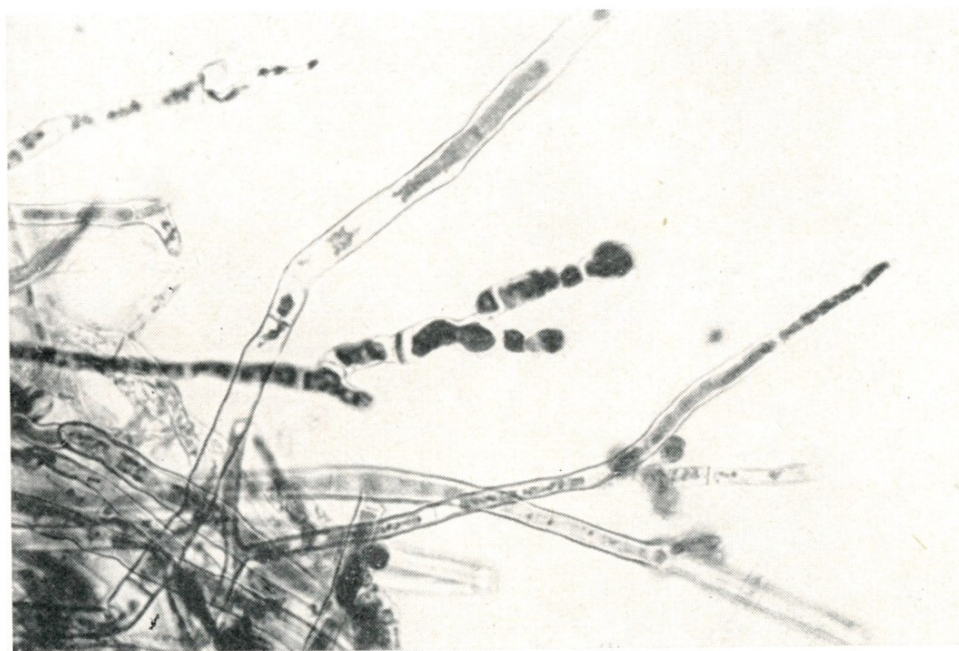


b

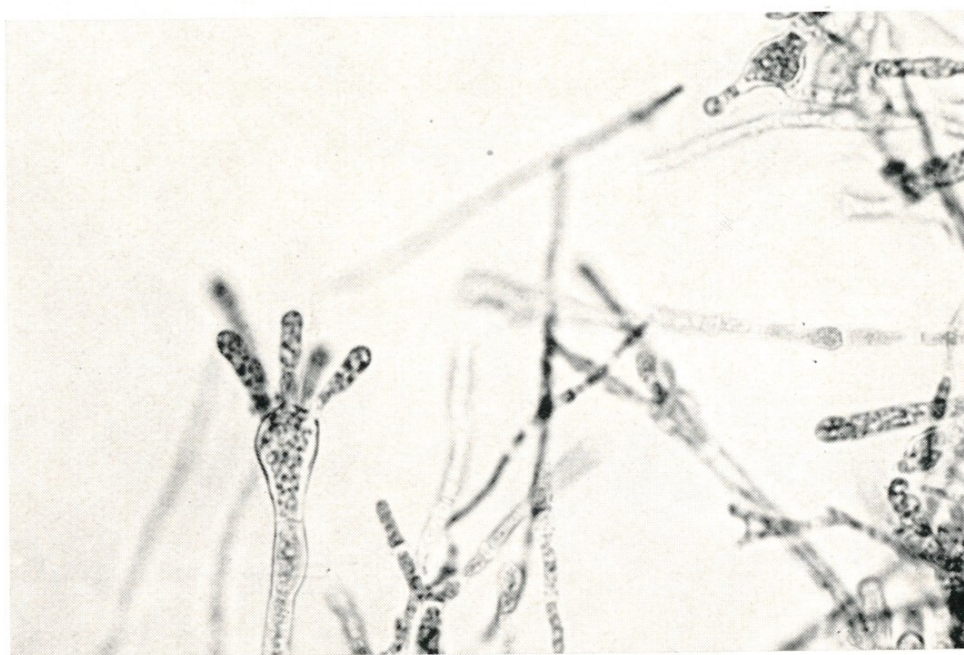
Fig. 4 - Palette del tipo compatto liscio
a) aspetto macroscopico (x 2)
b) sezione istologica (x 20)



5



6



7

Fig. 5-6-7 - Pseudovesicicole visibili nelle palette dissezionate, il cui micelio forma cellule globose. (fig. 5-7: x 260; fig. 6: x 250)

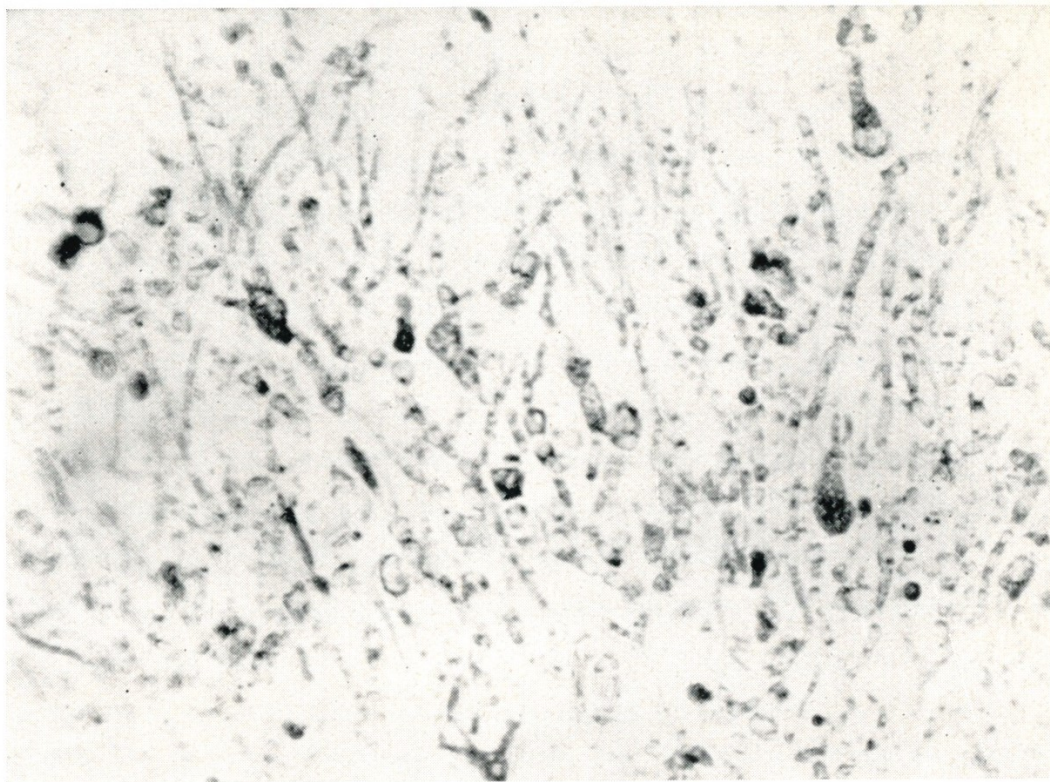


Fig. 8 - Sezione istologica ove sono visibili alcune cellule globose (x 250).



Fig. 9 - Coltura miceliare superficiale mostrante la formazione di conidiofori (x 250).

A volte diverse palette confluiscono, si accrescono intrecciando le loro ife periferiche, ed acquistano così l'aspetto di grosse palette (fig. 1). Alcuni conidi non germinano e si ritrovano immutati nel terreno anche dopo 140 ore di fermentazione ed oltre. E' stato osservato che i tipi di palette che si sviluppano precipuamente sono tre. Quello che ricorre più frequentemente (fig. 2 a e 2 b) consiste in un centro di crescita che si sviluppa radialmente in tutte le direzioni; nell'interno le ife sono così strettamente intrecciate che è impossibile distinguere gli elementi singoli. Osservando a piccolo ingrandimento la superficie delle palette si vede che essa è costituita da frange di ife più o meno addensate; microscopicamente le ife si presentano sottili lisce uniformi contenenti citoplasma finemente vacuolizzato. Questo tipo di palette è stato precedentemente da me chiamato *fl* (fluffy loose ⁽²⁾) cioè fioccoso-lassa).

Il secondo tipo è rappresentato da palette la cui parte interna va incontro ad una autolisi precoce e si trova quindi svuotata, mentre la zona periferica è costituita da uno stroma compatto in cui non si distinguono più le singole ife neppure sulla superficie esterna la quale si presenta perciò liscia lucente e priva di « frange ». La parte interna, come è stato detto, è svuotata e ripiena di liquido colturale con detriti ifali. Questo tipo di palette è stato definito *hs* (hollow smooth = vuoto liscio). Piggiando fra due dita questa palette scoppia come una vescicola piena d'acqua (fig. 3b).

Il terzo tipo di palette ha un aspetto intermedio fra le due sopra descritte. In essa la parte centrale è costituita da micelio compatto, mentre perifericamente le ife appaiono cortissime e in alcuni casi indistinguibili anche all'osservazione microscopica. La superficie della palette si presenta quindi liscia, compatta e senza « frange ». Questo tipo è stato chiamato *c.s.* (compact smooth = compatto liscio).

I conidi germinano dopo le prime ore di incubazione dando luogo a un tubo germinativo che in seguito si ramifica sviluppandosi radialmente in tutte le direzioni. Nelle prime 24 ore la colonia appare come un fiocchetto lasso che perde la sua forma se prevelato dal liquido. In questo primo stadio le ife periferiche sono lunghe sottili flessuose con citoplasma finemente vacuolizzato.

La parte centrale è costituita da cellule ifali un po' rigonfie, che si intrecciano saldamente fra loro e nelle prime 48 ore acquistano l'aspetto quasi di un tessuto compatto. Più tardi le ife periferiche che si sviluppano, appaiono più corte di quelle osservate a 24 ore; e fra esse si notano numerosi tratti ed apici ifali gonfi, ipertrofici; questi via via diven-

gono più numerosi ed assumono l'aspetto di grosse cellule globose a citoplasma granuloso.

I tre tipi di palette sopra descritte si differenziano entro le 48 ore. Mentre nel tipo *fl* perifericamente continua la crescita di ife lunghe sottili flessuose, negli altri due tipi *hs* e *cs*, le ife radiali appaiono più corte ed i tratti apicali si rigonfiano divenendo tozze ife con apici slargati e ricco contenuto citoplasmatico fortemente basofilo. Man mano che questo fenomeno si rende evidente, la superficie della palette appare liscia, compatta, lucente. Nelle colonie di tipo *hs* la parte più interna subisce un processo di autolisi per cui in sezione esse appaiono svuotate e ripiene di liquido con detriti cellulari.

Tutti i tipi di palette continuano a crescere anche oltre la 48^a ora.

CRESCITA ZONATA NELLA PALLETTA.

Facendo delle sezioni istologiche delle palette di 5-10 μ opportunamente colorate, la colonia appare zonata concentricamente. Questa zonatura consiste in una alternanza di anelli costituiti in prevalenza di ife lunghe e sottili ed altri da cellule ifali rigonfie o globose. Queste ultime dopo colorazione appaiono come vescicole vuote o intensamente colorate a seconda del contenuto citoplasmatico che vi permane o passa in nuove ife che da esse prendono origine. Questi elementi, meno cospicui nelle palette di tipo « loose » sono più numerosi in quelle di tipo « smooth ». In queste ultime la zonatura appare ad anelli concentrici più ravvicinati poichè la crescita periferica delle ife è molto ridotta (figg. 2b; 3c; 4b).

PROPRIETÀ' DEGLI ELEMENTI GLOBOSI.

a) *Proprietà citologiche.*

In seguito a colorazione con ematossilina-eosina le ife globose appaiono molto più basofile delle ife vegetative normali. Esse contengono anche una considerevole quantità di amido presumibilmente di riserva, e trattate con la soluzione iodica di Lugol acquistano un colore bruno o verde bluastrò. Questa sostanza può essere estratta con il 10 per cento di KOH a 120°C e precipitata con alcool; essa dà la tipica colorazione bluastra se trattata con iodio.

b) *Incapacità di produrre acido cogico.*

Le palette, consistenti soprattutto di elementi ifali globosi non sono in grado di ossidare il glucosio ad acido cogico ma possono accumularlo in forma di amido; sotto questo aspetto esse si comportano come le ife corte e ispessite che si formano nei piccoli fermentatori da 5 litri agitati a forte velocità. In relazione alla interpretazione della loro natura come conidiofori abortivi (v. più avanti) è interessante notare che in quei rari casi in cui si ha formazione di conidiofori nelle colture sommerse in beuta, non ha luogo produzione di acido cogico.

c) *Resistenza al calore e all'essiccamento (50°C) delle palette consistenti prevalentemente di elementi ifali globosi.*

Le palette del tipo *cs* si sono rivelate di una particolare resistenza e mantengono la capacità di proliferare anche dopo essiccamento mediante esposizione in termostato per 3 ore a 50°C. Esse infatti omogeneizzate, dopo essere state così disseccate, in un frullatore elettrico in modo tale da liberare le cellule situate nella parte interna della palette, e inoculate in nuovo terreno colturale, danno luogo a nuova crescita. Nessun micelio vegetativo potrebbe sopravvivere alla temperatura di 50°C per 3 ore; le ife globose rappresentano dunque un particolare tipo di micelio che differisce da quello vegetativo normale.

UNA INTERPRETAZIONE SULLA NATURA DEGLI ELEMENTI GLOBOSI.

Come è stato detto sopra, nelle normali fermentazioni di *A. flavus* in beute agitate non si ha formazione di conidiofori e la sporificazione sopravviene raramente e in condizioni non ancora ben chiarite. Sembrerebbe dunque che la comparsa delle ife globose o ipertrofiche sostituisca la comparsa della vescicola conidiofora nel ciclo di *A. flavus* e che quelle rappresentino delle forme abortive di vescicole. Nelle sezioni istologiche delle palette contenenti molti elementi globosi non è difficile riconoscere alcune « pseudovesicole » con estroflessioni che suggeriscono la formazione di sterigmi (fig. 8). Le osservazioni microscopiche del micelio delle palette rivela la presenza di numerose forme di transizione dal tipico conidioforo con sterigmi veri e propri alle vescicole con estroflessioni ifali fino agli elementi globosi risultanti forse da inibizioni della crescita (figg. 5; 6; 7). La fig. 9 che mostra una crescita di *A. flavus*

in coltura superficiale con tipica formazione di conidiofori è data per una comparazione.

Ringraziamenti. — L'autore desidera ringraziare il Prof. Ciccarone (Università di Bari) e il Dr. K. Raper (Università di Madison, U.S.A.) per gli utili suggerimenti; il Dr. A. Carilli per aver condotto alcuni esperimenti sulla resistenza al calore; il Prof. Lelli (Lab. di Microbiologia, Istituto Superiore di Sanità) per l'aiuto prestato nella preparazione delle sezioni al microtomo ed il Prof. E. B. Chain, F.R.S. per il suo continuo interessamento.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CAMPOSANO A., CHAIN E. B. e GUALANDI G. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24 :234 (1961).
- (²) TESTI-CAMPOSANO A. - Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 448 (1959).
- (³) CAMICI L., SERMONTI G. e CHAIN E. B. - Bull. World Hlth.. Org., 6: 265 (1952).

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1534 del 14 luglio 1956

MS