

Carmelo Rigano & Roberto Taddei

**Estrema acido-resistenza dell'alga  
*Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler  
vivente alla solfatara di Pozzuoli (Napoli). \***

In due precedenti note (RIGANO, 1965; RIGANO & CONFORTI, 1967) è stata studiata l'ecologia di un'alga unicellulare che vive nei terreni fumarolici acidi della solfatara di Pozzuoli e della località Pisciarelli, vicino Napoli. L'alga è stata determinata come *Cyanidium caldarium* (TILDEN) GEITLER.

Il *C. caldarium* è una specie cosmopolita: essa è stata finora trovata a Giava, in Giappone, alla Dominica, nello Yellowstone Park (USA) ed in altre località dell'America del Nord.

Il *C. caldarium*, specie che colonizza gli ambienti vulcanici caldi e acidi, presenta una eccezionale acido- e termo-tolleranza; in natura infatti esso è stato trovato anche a pH 1 (HIROSE, 1950) ed alla temperatura di 60° C (BROCK, 1967). Le condizioni ecologiche trovate per il *C. caldarium* delle fumarole di Pozzuoli e dei Pisciarelli (RIGANO & CONFORTI, 1967) si avvicinano notevolmente a quelle trovate altrove per la stessa alga, soprattutto per quanto riguarda il pH che presenta valori molto bassi, fino a 1,4; la temperatura massima trovata è 53° C. Come il *C. caldarium* che si trova in altre località, quindi, anche l'alga che vive nei pressi di Napoli presenta una estrema acido-resistenza e vive su terreni ricchi di acido solforico. In base a questa ultima osservazione ecologica, abbiamo voluto

---

\* Lavoro eseguito con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito del Comitato Biologia e Medicina, Gruppo « Ecologia », presso l'Istituto Botanico dell'Università di Napoli (Facoltà di Scienze).

stabilire in laboratorio fino a quale limite sia spinta tale acido-resistenza dell'alga di Pozzuoli e fino a quale concentrazione di acido solforico essa sia in grado di sopravvivere e moltiplicarsi.

#### MATERIALI E METODI

L'alga, prelevata sterilmente da una fumarola, veniva coltivata in laboratorio sul mezzo di ALLEN (1959) alla temperatura di 45° C.

Le colture liquide di *C. caldarium*, effettuate allo scopo di stabilire i limiti dell'acido-resistenza di quest'alga, sono state allestite in provettoni cilindrici da 37 mm di diametro; esse erano in numero di 10 ed in ognuna è stato aggiunto acido solforico in quantità diversa (fino a 50 cc/l), come indicato nella tabella 1, dove è riportato anche il pH iniziale. Tali colture erano tenute alla temperatura di 45° C e ad illuminazione costante; la sorgente luminosa era costituita da lampade Philips tipo *daylight* e l'intensità luminosa alla superficie dei provettoni era di 4.000 lux. In esse inoltre veniva fatta gorgogliare una miscela di aria arricchita di CO<sub>2</sub> (5 %).

La crescita dell'alga era seguita mediante lettura al colorimetro alla lunghezza d'onda di 600 m $\mu$ .

#### RISULTATI E DISCUSSIONI

Nella tabella 1 sono riportati i tempi di generazione ( $T_g$ ) e le costanti di crescita ( $k$ ) delle colture di *C. caldarium* calcolati durante la fase esponenziale di crescita\*.

\* Il tempo di generazione ( $T_g$ ) è quello necessario perché il numero di cellule nella coltura si raddoppi; esso è stato calcolato con la seguente formula:

$$T_g = \frac{(T_2 - T_1) \cdot \log 2}{\log D_2 - \log D_1}$$

dove  $D_1$  e  $D_2$  sono le densità ottiche delle colture rispettivamente ai tempi  $T_1$  e  $T_2$ .

Il valore di  $k$  rappresenta numericamente la velocità di crescita.

Tra  $T_g$  e  $k$  esiste la relazione:

$$k \cdot T_g = \log 2$$

La crescita più rapida si è avuta alla concentrazione di 3 cc di  $H_2SO_4$ /l (0,0565 M), che corrisponde ad un pH di 1,4; è interessante notare che tale pH è quello da noi trovato in natura in presenza dell'alga. Oltre i 3 cc/l, l' $H_2SO_4$  diventa un inibitore; infatti le altre colture hanno presentato tempi di generazione progressivamente più elevati in rapporto all'aumentare della concentrazione dell'acido. Tuttavia la crescita dell'alga è stata evidente anche nella coltura N° 10, nella quale il valore iniziale del pH è 0,24 e la concentrazione dell'acido di 50 cc/l. Altre prove, eseguite alla stessa temperatura, ci hanno indicato che l'alga è in grado di sopportare concentrazioni di  $H_2SO_4$  maggiori.

Coltura N°	$H_2SO_4$ cc/l	pH iniziali	$T_g$ (ore)	k (ore <sup>-1</sup> · 10 <sup>-3</sup> )
1	0	5,45	35	8,6
2	1	1,80	29	10,4
3	3	1,40	28	10,9
4	6	1,10	28	10,8
5	10	0,90	29	10,5
6	16	0,70	30	10,1
7	22	0,54	32	9,5
8	30	0,42	33	9,2
9	40	0,32	37	8,1
10	50	0,24	40	7,5

TABELLA 1 — Colture di *Cyanidium caldarium*, proveniente dalla Solfatara di Pozzuoli, a varie concentrazioni di  $H_2SO_4$ . L'esperimento è stato condotto alla temperatura di 45°C.

Se noi rappresentiamo graficamente i nostri risultati (Fig. 1), vediamo che la velocità di crescita del *C. caldarium*, per concentrazioni dell'acido superiori a quella ottimale, è una funzione lineare (decescente) della concentrazione dell'acido. Dalla pendenza della retta è possibile calcolare una costante di inibizione: il suo valore è  $7,5 \cdot 10^{-3}$  ( $8,8 \cdot 10^{-3}$  in un altro esperimento condotto a 8.000 lux) e indica il tasso di inibizione che esercita 1 cc di  $H_2SO_4$  sulla velocità di crescita dell'alga.

In base a tali risultati è possibile prevedere che il limite massimo di resistenza all'acido da parte del *C. caldarium* è posto ad una concentrazione quasi 3 M (150 cc/l).

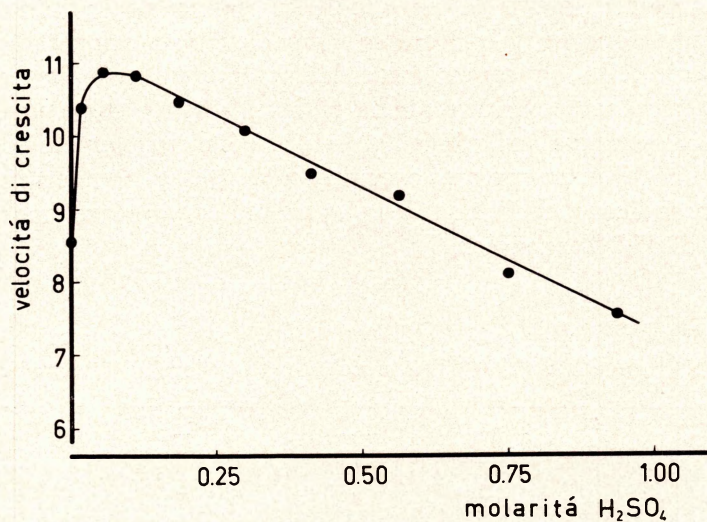


Fig. 1. - Velocità di crescita, k (espressa in ore<sup>-1</sup> · 10<sup>-3</sup>), di *Cyanidium caldarium* a 45°C in funzione della concentrazione di acido solforico.

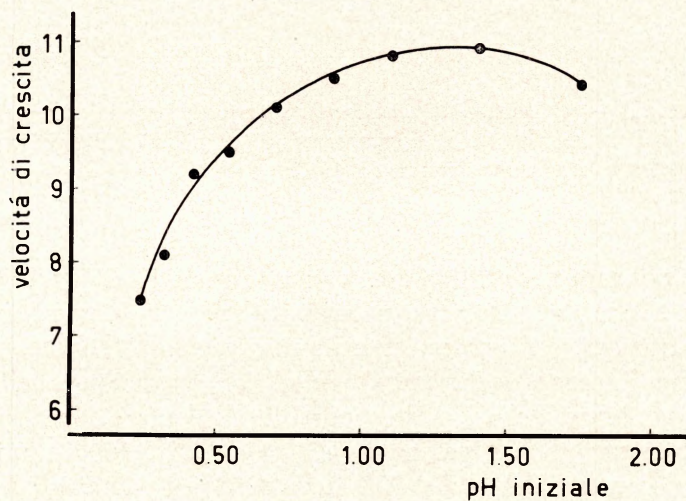


Fig. 2. - Velocità di crescita, k, di *Cyanidium caldarium* a 45°C in funzione del pH iniziale del mezzo.

### CONCLUSIONI

In base ai nostri risultati possiamo concludere che il *C. caldarium* di Pozzuoli possiede una tolleranza molto elevata nei confronti dell'acido solforico, potendo esso sopravvivere e moltiplicarsi in mezzi in cui la concentrazione dell'acido raggiunge o supera i 50 cc/l, anche se a tali concentrazioni la sua crescita è stata molto lenta. Poiché il pH del substrato contenente tale quantità di acido solforico è di 0,24, valore questo mai trovato in natura in presenza dell'alga, possiamo dire che il *C. caldarium* possiede una difesa nei confronti degli effetti tossici dell'acido che gli consente un margine di tolleranza molto ampio nei confronti di questo fattore (naturale per esso) e di gran lunga superiore a quello necessario per sopravvivere ai pH che esso trova nel suo ambiente naturale.

Particolarmente significativi sono i nostri risultati dal punto di vista della identificazione dell'alga di Pozzuoli come *Cyanidium caldarium*: infatti anche il *C. caldarium* dello Yellowstone Park era stato coltivato in  $H_2SO_4$  1 N (ALLEN, 1959) e tale acido-resistenza rappresenta quindi un elemento diagnostico molto importante di questa specie dal momento che, a nostra conoscenza, nessun'altra alga è stata coltivata in mezzi così acidi.

Il *C. caldarium*, coltivato nelle condizioni sopra esposte, cresce molto lentamente, se paragonato ad altre alghe termali, e questo potrebbe derivare da più cause, quali:

presenza dell'acido solforico che, pur non essendo tossico, impedisce tuttavia la completa funzionalità di quest'organismo;

l'insolubilità della  $CO_2$  in mezzi così acidi.

Gli altri ceppi di *C. caldarium* trovati altrove hanno mostrato anche una estrema termo-tolleranza: essi sono stati trovati in natura fino a 75-80° C (COPELAND, 1936; HIROSE, 1950) e coltivati in laboratorio fino a 55° C (ASCIONE & AL., 1966). Il *C. caldarium* dei dintorni di Napoli cresce in natura fino a 53° C; esso quindi sembra essere dotato di una termo-resistenza più bassa di quella che presentano i ceppi trovati in altre località. A parte tale differenza, tutte le caratteristiche ecolo-

giche, morfologiche (RIGANO, 1965; RIGANO & CONFORTI, 1967) e colturali da noi finora indagate ravvicinano in modo inequivocabile il *C. caldarium* che vive nei dintorni di Napoli a quello vivente altrove. Tuttavia, anche per quanto riguarda il limite massimo di termo-resistenza, i valori da noi trovati in natura coincidono con quelli più recenti trovati da BROCK (1967) nello Yellowstone Park (60° C) (v. RIGANO & CONFORTI, 1967).

#### RIASSUNTO

Gli Autori hanno effettuato esperimenti sulla crescita e sull'acido-resistenza dell'alga *Cyanidium caldarium* proveniente dalla solfatara di Pozzuoli (Napoli). Il *C. caldarium*, che vive in natura su substrati molto acidi (esso è stato trovato fino a pH 1,4), ha mostrato in coltura una acido-tolleranza molto elevata; la sua crescita infatti, sebbene migliore nelle colture contenenti da 3 fino a 6 cc/l di ac. solforico, è stata apprezzabile anche nelle colture contenenti 50 cc di ac. solforico per litro (pH 0,24) e oltre.

#### SUMMARY

The Authors have studied the growth and the acid-resistance of the alga *Cyanidium caldarium* withdrawn at Solfatara of Pozzuoli. The *C. caldarium*, that lives in nature in very acid environments (until pH 1,4), grows in the laboratory at very high concentration of sulfuric acid. The alga exhibits appreciable growth in medium containing 50 cc/l of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 0,24)

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. B., 1959. *Studies with Cyanidium caldarium an anomalously pigmented chlorophyte*. Ark. Microbiol. **32**, 270-277.
- ASCIONE R., W. SOUTHWICK & J. R. FRESCO, 1966. *Laboratory culturing of a thermophilic alga at high temperature*. Science **153**, 752-755.
- BROCK T. D., 1967. *Life at high temperatures*. Science **158**, 1012-1019.
- COPELAND J. E., 1936. *Yellowstone thermal Myxophyceae*. Ann. New York Acad. Sci. **36**.
- HIROSE H., 1950. *Studies with Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER, with special reference to its ecology and distribution in Japan*. Journ. Jap. Bot. **25** (8), 179-184.
- HIROSE H., 1958. *Rearrangement on the systematic position of a thermal alga Cyanidium caldarium*. Bot. Mag. **71** (844), 347.
- LEWIN R. A., 1961. *Cyanidium caldarium a Cryptococcalean?* Phyc. News Bull. **14**.
- RIGANO C., 1965. *Presenza dell'alga unicellulare Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER nei terreni fumarolici dei Campi Flegrei e di Ischia (Napoli)*. Delpinoa **6-7**, 277-284.
- RIGANO C. & T. CONFORTI, 1967. *Ecologia e distribuzione dell'alga unicellulare Cyanidium caldarium (TILDEN) GEITLER nei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa **8-9**, 1.