

Paolo De Luca *

Aldo Musacchio *

Roberto Taddei *

**Diverso comportamento in eterotrofia
delle due forme di « *Cyanidium caldarium* »
dei Campi Flegrei (Napoli). ****

In precedenti lavori (CASTALDO 1968 e 1970; DE LUCA e TADDEI 1970 e 1972) è stata segnalata, presso le fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli), la presenza di due differenti alghe, fino ad allora confuse ed indicate sotto l'unico nome *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler.

In tali lavori sono state descritte le principali differenze morfologiche e fisiologiche, in base alle quali le due alghe avrebbero dovuto essere assegnate a entità sistematiche ben distinte. In attesa di ulteriori studi diretti a stabilire la loro definitiva posizione sistematica, tali due alghe sono state indicate con i nomi provvisori *Cyanidium caldarium* forma A e *C. caldarium* forma B.

Nello studio comparato di queste due alghe dei Campi Flegrei, abbiamo posto l'attenzione anche sul problema della crescita in eterotrofia, per verificare se in tali condizioni sperimentali le due alghe si comportassero in maniera analoga o discordante.

Per quanto riguarda questo aspetto fisiologico, su *Cyanidium caldarium* sono state effettuate osservazioni soltanto da ALLEN

* Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli (Italia).

** Lavoro eseguito con un contributo, per ricerche ecologiche, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Comitato Biologia e Medicina.

(1959) e da NICHOLS e BOGORAD (1962). In entrambi i lavori viene riferito che *C. caldarium* è capace di crescere in condizioni eterotrofiche.

Inoltre, secondo ALLEN, l'alga si sviluppa al buio priva di clorofilla e ficocianina, tranne alcune colonie (mutanti) che posseggono piccole quantità di clorofilla. Secondo NICHOLS e BOGORAD, le cellule producono sempre, al buio, quantità dosabili di clorofilla; la ficocianina non si forma in tali condizioni, a meno che l'alga non venga allevata su Agar-agar USP della Fisher.

MATERIALI E METODI

Abbiamo utilizzato un ceppo di *Cyanidium caldarium forma A* ed un ceppo di *C. caldarium forma B*, gli stessi usati da DE LUCA e TADDEI nei precedenti lavori.

Le alghe sono state coltivate su mezzo di ALLEN (1959) con le modificazioni più sotto indicate.

Il pH del mezzo era portato a 1,5 mediante aggiunta di H_2SO_4 .

Le colture sterili, in beute di vetro da un litro, erano poste su piano oscillante di plexiglas ed illuminate dal basso per mezzo di lampade Philips TLD 30W/55, che assicuravano luce continua di 8.000 lux. Le prove al buio erano condotte nelle stesse condizioni, ma con beute rivestite di carta argentata perfettamente opaca.

L'ambiente era termostato a 40°C.

La crescita delle alghe era seguita misurando l'assorbimento al colorimetro alla lunghezza d'onda di 550 m μ .

Fra le prove di crescita, effettuate sulle due alghe variando le condizioni colturali, riteniamo opportuno riportare solo quelle maggiormente significative. Al terreno normale di ALLEN (1959), privato dell'unica sostanza contenente azoto, cioè $(NH_4)_2SO_4$, sono state aggiunte diverse sostanze e le colture sono state mantenute alla luce o al buio, come qui appresso indicato:

- | | |
|--|-----------|
| 1) Nitrato [NaNO_3 0,85 g / litro] | alla luce |
| 2) Ammonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,32 g / litro] | alla luce |
| 3) Ammonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,32 g / litro] + Glucosio [3 g / litro] | alla luce |
| 4) Glutammato [acido glutammico 3 g / litro] | alla luce |
| 5) Ammonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,32 g / litro] + Glucosio [3 g / litro] | al buio |
| 6) Glutammato [acido glutammico 3 g / litro] | al buio |

RISULTATI

La crescita delle due alghe nelle varie condizioni colturali è graficamente rappresentata e messa a confronto nelle figg. 1 e 2.

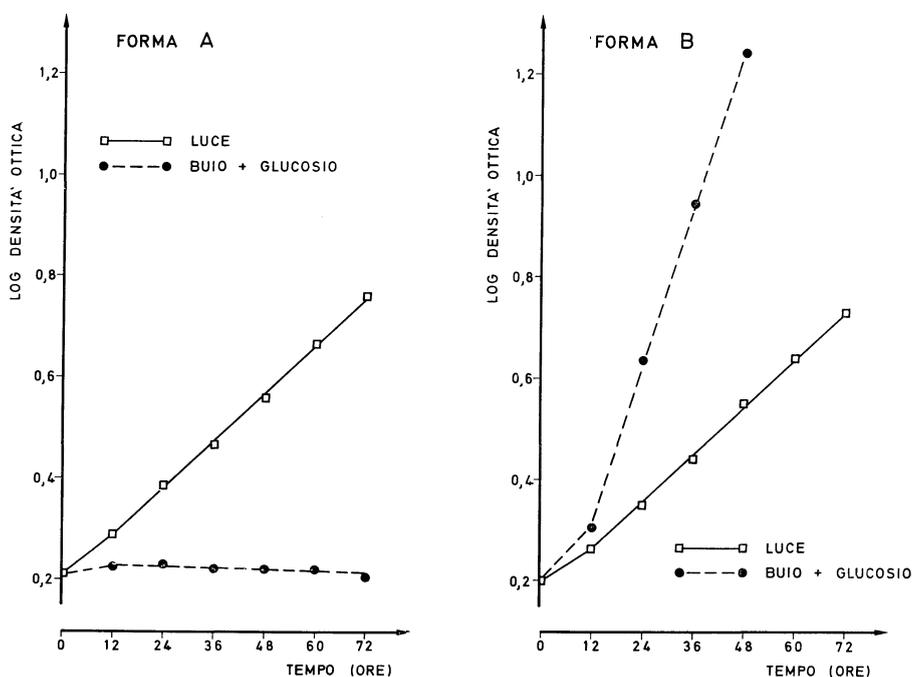


Fig. 1

Comportamento in autotrofia ed in eterotrofia delle due alghe dei Campi Flegrei, provvisoriamente chiamate *Cyanidium caldarium* forma A (a sinistra) e *C. caldarium* forma B (a destra). Substrato: Allen contenente ammonio; T = 40°C; pH = 1,5.

Si noti come la *forma B* cresce in eterotrofia (al buio su glucosio), mentre la *forma A* non ne è capace.

La fig. 1 mostra il comportamento di *C. caldarium forma A* (a sinistra) e di *C. caldarium forma B* (a destra) coltivate alla luce oppure al buio con aggiunta di glucosio.

Appare evidente che la *forma A* non cresce al buio su glucosio, mentre la *forma B* si sviluppa in tale condizione con una velocità di crescita che è tre volte maggiore di quella registrata in autotrofia.

A questi risultati vanno aggiunte le seguenti osservazioni da noi eseguite.

Le cellule della *forma A*, poste in condizioni eterotrofiche, non muoiono, ma appaiono inalterate per forma e colore dopo oltre 6 settimane; esse riprendono immediatamente la crescita, se riportate nuovamente alla luce. Il comportamento dell'alga è identico su vari altri substrati organici (amminoacidi, carboidrati, ecc.).

Le cellule della *forma B*, in eterotrofia, si sviluppano prive di clorofilla e di ficocianina e appaiono quindi di colore giallo smorto. Tali cellule, però, poste in condizioni di autotrofia, lentamente riprendono il loro caratteristico colore verde intenso.

La fig. 2 mostra il comportamento delle due alghe alla luce su terreni contenenti rispettivamente ammonio, ammonio + glucosio, glutammato.

Le cellule della *forma A*, alla luce, si comportano allo stesso modo in presenza ed in assenza di glucosio; su terreno contenente glutammato, come unica fonte di azoto, esse crescono invece molto lentamente e tendono a sbiancarsi.

Le alghe della *forma B*, alla luce, utilizzano bene le sostanze organiche; crescono infatti molto più velocemente quando al mezzo minerale sia stato aggiunto glucosio o glutammato.

Inoltre, per la *forma B*, la crescita su glucosio è pressoché identica al buio (fig. 1) ed alla luce (fig. 2).

Le cellule della *forma B*, poste alla luce su mezzo contenente molecole organiche, tendono a perdere i pigmenti fotosintetici.

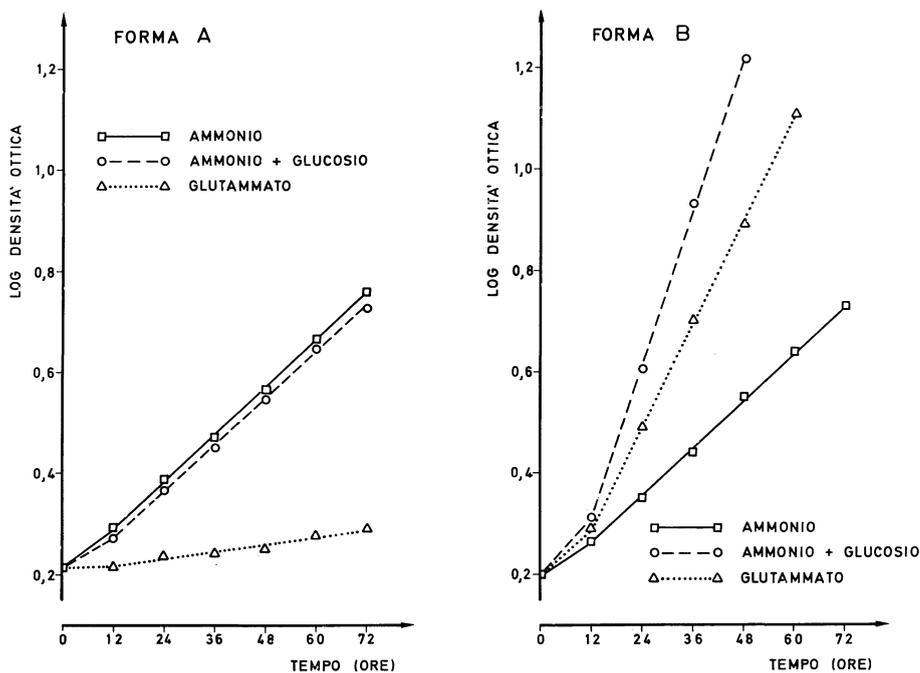


Fig. 2

Crescita alla luce di *Cyanidium caldarium* forma A (a sinistra) e di *C. caldarium* forma B (a destra), su tre diversi substrati: *Allen* contenente ammonio; *Allen* con aggiunta di glucosio; *Allen* privo di ammonio con aggiunta di glutammato; T = 40°C; pH = 1,5.

Si noti come la crescita della *forma A* è identica su mezzo minerale e su mezzo arricchito di glucosio, mentre è minima su mezzo contenente glutammato come unica fonte di azoto; la *forma B* invece utilizza abbondantemente i substrati organici (glucosio e glutammato).

Nella seguente tabella sono riportate le costanti di crescita k^* , per entrambe le alghe, nelle diverse condizioni colturali impiegate.

COSTANTI DI CRESCITA (K) IN VARIE CONDIZIONI TROFICHE

	LUCE				BUIO	
	nitrato	ammonio	ammonio + glucosio	glutam- mato	ammonio + glucosio	glutam- mato
Cyanidium caldarium forma A	4,9	9,3	9,2	1,1	—	—
Cyanidium caldarium forma B	—	7,6	25,3	16,6	26,1	6,6

Le nostre due alghe, infine, non formano ficocianina al buio, neppure se allevate su Agar-agar USP della Fisher, diversamente da quanto constatato da NICHOLS e BOGORAD per il ceppo di *C. caldarium* da loro studiato. Questa nostra prova, ovviamente, non ha valore assoluto, perché una eventuale sostanza stimolante la sintesi dei pigmenti e presente come impurità, può trovarsi saltuariamente in alcune partite di agar.

CONCLUSIONI

Dai risultati qui esposti appare evidente che *C. caldarium forma A* è autotrofo obbligato, mentre *C. caldarium forma B* è eterotrofo facoltativo.

C. caldarium forma A, incapace di crescere in eterotrofia, riesce tuttavia ad assorbire alcune molecole organiche, come si

*

$$k = \frac{\Delta \log (\text{densità ottica})}{\Delta \text{ tempo (in ore)}} \cdot 10^3$$

deduce dalla avvenuta crescita alla luce su mezzo contenente glutammato come unica fonte di azoto.

Nei riguardi di tale caratteristica quest'alga si comporta come la maggior parte delle Cianoficee, anch'esse in grado di assorbire composti organici, ma incapaci di accrescersi in assenza di luce (STANIER e Altri 1971). D'altra parte esempi di alghe eucariote, che si comportano come la maggior parte delle Cianoficee e come *C. caldarium forma A*, esistono fra le Xantofite, le Dinoflagellate, le Diatomee (DANFORTH 1962).

La maggior parte delle alghe eucariote, viceversa, è capace di crescere in eterotrofia, così come *C. caldarium forma B*.

Riguardo alla capacità di sintetizzare in eterotrofia i pigmenti fotosintetici, la *forma B* (la sola, fra le due, ad essere eterotrofa) non sintetizza al buio né clorofilla né ficocianina; alla luce, su glucosio, la quantità di tali pigmenti è enormemente ridotta.

A tale proposito, per quanto risulta dalla letteratura, non è possibile formulare alcuno schema: nell'ambito di alcuni generi di alghe eterotrofe facoltative, infatti, esistono specie che sintetizzano al buio i pigmenti e specie che non li sintetizzano, e questo è il ben noto caso del genere *Chlorella* (SMILLIE e SCOTT 1969; GOODWIN 1971); addirittura la capacità di sintetizzare pigmenti al buio può variare nei diversi ceppi di una stessa specie.

Per quanto riguarda i raffronti tra le nostre due alghe ed i ceppi di *Cyanidium caldarium* studiati dagli altri Autori, possiamo avvicinare il ceppo « *wild type* » di ALLEN e la nostra *forma B*. Non possiamo invece avvicinare nessuna delle nostre alghe ai « mutanti » di ALLEN, che crescono al buio formando clorofilla (anche se i grafici da lei pubblicati mostrano la presenza di minime quantità di clorofilla); neppure possiamo avvicinare i nostri ceppi al *C. caldarium* studiato da NICHOLS e BOGORAD, che cresce al buio accumulando piccole, ma dosabili quantità di clorofilla.

RIASSUNTO

Gli Autori hanno studiato il comportamento in autotrofia ed in eterotrofia di due alghe termali e acidofile dei Campi Flegrei (Napoli), provvisoriamente chiamate da DE LUCA e TADDEI (1970) *Cyanidium caldarium forma A* e *C. caldarium forma B*.

Le due alghe sono state coltivate su diversi substrati organici e minerali, alla luce o al buio.

Cyanidium caldarium forma A non cresce al buio su glucosio; tuttavia le cellule si mantengono in vita per oltre sei settimane in tale condizione.

Il glutammato viene assorbito e utilizzato dall'alga: infatti, alla luce su glutammato, la crescita dell'alga è lieve ma evidente.

Cyanidium caldarium forma B cresce su glucosio, sia alla luce che al buio, tre volte meglio che in condizioni autotrofiche.

L'alga cresce bene anche su glutammato alla luce, con velocità doppia di quella su mezzo interamente minerale.

Tale alga mostra quindi, nel complesso, una decisa predisposizione all'eterotrofia, confermata anche dal fatto che in condizioni eterotrofiche essa non sintetizza i pigmenti fotosintetici (clorofilla, ficocianina) ed appare di colore giallo smorto (carotenoidi).

In definitiva, *Cyanidium caldarium forma A* è autotrofa obbligata come la maggior parte delle Cianofitofite, mentre *Cyanidium caldarium forma B* è eterotrofa facoltativa come la maggior parte delle alghe eucariote.

SUMMARY

The AA. have investigated the autotrophic and heterotrophic behaviour of two thermal acidophilic algae of Campi Flegrei (Naples).

Cultures of both algae, temporarily called by DE LUCA and TADDEI *Cyanidium caldarium forma A* and *C. caldarium forma B* respectively (1970), were experimented on different organical and mineral substrates, in the light and in the dark.

C. caldarium forma A doesn't grow in darkness on glucose; yet cells keep alive for six weeks or more under these conditions. Glutamate is absorbed and utilized by this alga, whose growth in the light on such a substrate is slight but evident.

C. caldarium forma B grows on glucose, both in the light and in the dark, three times as much as under autotrophic conditions. Glutamate too promotes the algal growth in the light at a rate twice as high as on entirely mineral substrates.

In the whole, this alga shows a strong tendency to heterotrophy as is confirmed by the observation that in heterotrophic conditions it does not synthesize photosynthetic pigments (chlorophyll, phycocyanin) and features a pale yellow colour (carotenoids).

After all, *C. caldarium forma A* is, like most Cyanophyta, an obligatory autotrophic alga, while *C. caldarium forma B*, like most eucaryotic algae, is a facultative heterotrophic one.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. B., 1959. *Studies with Cyanidium caldarium an anomalously pigmented chlorophyte*. Ark. Microbiol., **32**: 270-277.
- CASTALDO R., 1968. *Ricerche sull'ultrastruttura del Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, **8-9**: 135-147.
- —, 1970. *Ultrastruttura di due forme isolate dalle popolazioni di Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler*. Delpinoa, **10-11**: 91-109.
- DANFORTH W. F., 1962. *Substrate assimilation and heterotrophy*; in: LEWIN R. A., *Physiology and biochemistry of Algae*, 99-123. Academic Press, New York and London.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium?*. Delpinoa, **10-11**: 79-89.
- —, 1972. *Crescita comparata di due forme di «Cyanidium caldarium» dei Campi Flegrei (Napoli) in presenza di diverse fonti di azoto*. Delpinoa, **12-13**: 3-8.
- GOODWIN T. W., 1971. *Biosynthesis by chloroplasts*; in: GIBBS M., *Structure and function of chloroplasts*, 215-276. Springer-Verlag, Berlin.
- NICHOLS K. E., L. BOGORAD, 1962. *Action spectra studies of phycocyanin formation in a mutant of Cyanidium caldarium*. Bot. Gaz., **124**: 85-93.
- SMILLIE R. M., N. S. SCOTT, 1969. *Organelle biosynthesis: the chloroplast*; in: *Progress in molecular and subcellular biology*, **1**: 136-202. Springer-Verlag, Berlin.
- STANIER R. Y., R. KUNISAWA, M. MANDEL, G. COHEN-BAZIRE, 1971. *Purification and properties of unicellular blue-green Algae*. Bacteriological Reviews, **35**: 171-205.