

Elio B r e s c i a n o \*

Gabriele P i n t o \*\*

Maria Luisa V u o t t o \*

**Indagini preliminari sull' immunosistemica  
di due specie di alghe termofile ed acidofile dei  
Campi Flegrei (Napoli). \*\*\***

Numerosi Autori hanno studiato la flora degli ambienti termali acidi di vari continenti (MENEHINI 1839, le sorgenti di Acquasanta presso Ascoli Piceno, Italia; GALDIERI 1899, le fumarole della solfatara presso Napoli, Italia; TILDEN 1910, le fumarole e le acque acide dello Yellowstone Park, U.S.A.; GEITLER e RUTTNER 1935, le fumarole del vulcano Lawu a Giava, Indonesia; etc.), riportando la presenza di una sola alga. Essa fu indicata con vari binomi, ma dal 1935 viene sempre chiamata con il binomio istituito da GEITLER, e cioè *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler.

DE LUCA e TADDEI (1970), studiando la microflora dei Campi Flegrei (Napoli), isolarono non una bensì due alghe eucariote acidofile e termofile. Le due alghe erano unicellulari, sferiche, e presentavano rispettivamente un diametro di 2-5 e 3-11  $\mu$ . Ambedue si moltiplicavano per autospore, sempre in numero di 4 nell'alga piccola, mentre nella grande il numero variava da 4 a 32.

CASTALDO (1970) pose in evidenza in entrambe le alghe, con osservazioni al microscopio elettronico, la presenza di un nucleo e di un cloroplasto primitivo. Mentre, però, l'alga piccola presen-

---

\* Istituto di Patologia Generale, I Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli (Italia).

\*\* Istituto di Botanica, Facoltà di Scienze, Università di Napoli (Italia).

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

tava un solo mitocondrio ed era priva di vacuolo, l'alga grande possedeva numerosi mitocondri ed un grosso vacuolo.

In base ai caratteri sopra riportati le alghe erano entrambe riferibili alla specie *Cyanidium caldarium*, secondo la descrizione fattane da GEITLER. In attesa di una revisione sistematica le due alghe erano, in via provvisoria, indicate rispettivamente come *Cyanidium caldarium forma A* (l'alga piccola) e *C. caldarium forma B* (l'alga grande).

Allo scopo di porre in evidenza i rapporti sistematici esistenti tra le due alghe, furono condotte indagini nel campo della fisiologia (DE LUCA et al. 1972 a; DE LUCA e TADDEI 1972) e della chemiosistematica (DE LUCA et al. 1972 b; BOENZI et al. 1977). Tali studi sortirono risultati interessanti, anche se non definitivi, essendo state riscontrate differenze significative tra il *C. caldarium forma A* ed il *C. caldarium forma B*.

Recentemente alcuni Autori (BROWN e LESTER 1965; BROWN e WALNE 1967), utilizzando metodiche immunologiche, hanno ottenuto risultati soddisfacenti nello studio di alcune alghe eucariote unicellulari. Abbiamo ritenuto utile, per tale motivo, tentare di aggiungere ai dati forniti dai lavori precedenti sul *Cyanidium caldarium* s. l., quelli eventualmente ottenibili con indagini nel campo della immunosistematica.

Un primo approccio a questo tipo di indagini forma l'oggetto del presente lavoro.

#### MATERIALI E METODO

*Animali.* Vengono utilizzati conigli New Zealand di sesso femminile e del peso medio di 2000 g.

*Alghe.* Sono stati utilizzati gli stessi ceppi (uno di *C. caldarium forma A* ed uno di *C. caldarium forma B*) isolati ed impiegati da DE LUCA e TADDEI (1970). Le cellule sono state coltivate

sterilmente su mezzo di Allen (ALLEN 1959) a pH 1,5 in beute di vetro da un litro, poste su di un piano oscillante di plexiglass. L'illuminazione, proveniente dal basso, è stata fornita da lampade Philips TLD 30 W/55, che assicurano una illuminazione continua di 8000 lux. La temperatura di crescita è stata di 35° C. Le alghe sono state raccolte nella fase esponenziale dello sviluppo, lavate due volte in acqua di fonte sterile e sospese in tampone fosfato 0,1 M (pH = 7,0).

*FCA.* L'Adiuvante Completo di Freund è il prodotto n. 0638 dei Difco Laboratories di Chicago, Illinois, U.S.A.

*BSA.* La Siero-Albumina Bovina è stata acquistata presso i laboratori della Armour Pharmaceutical Company di Kankakee, Illinois, U.S.A.

*Preparazione delle alghe.* Le colture di *C. caldarium forma A* e di *C. caldarium forma B* vengono centrifugate a 5000 rpm  $\times$  10 min e le cellule sospese e lavate per tre volte in NaCl 0,15 M (SF). Viene eseguita una conta alla camera di Burkner ed allestita una doppia serie di aliquote da 1 ml contenenti rispettivamente  $4 \times 10^6$  cellule di *C. caldarium forma A/mm*<sup>3</sup> e  $1 \times 10^6$  cellule di *C. caldarium forma B/mm*<sup>3</sup>. Tali aliquote vengono conservate in congelatore a — 20° C fino al momento dell'uso. Prima dell'utilizzazione vengono scongelate, centrifugate a 5000 rpm  $\times$  10 min e sospese nell'opportuno volume di SF.

*Preparazione del Siero Normale di Coniglio.* Il SNC è ottenuto mediante salasso, dalla vena marginale dell'orecchio, degli animali che verranno successivamente immunizzati. I sieri vengono uniti in pool e conservati in congelatore a — 20° C. Prima dell'uso il pool viene centrifugato a 15000 rpm  $\times$  30 min.

*Immunizzazione.* Gli animali vengono divisi in due gruppi di cinque conigli ciascuno. Poiché si vuol far corrispondere, almeno in prima approssimazione, la superficie attiva introdotta in ogni animale del primo gruppo a quella introdotta in ogni animale del secondo gruppo (essendo la superficie media

di ogni cellula di *C. caldarium forma B* circa 4 volte più grande di quella di *C. caldarium forma A*), si decide di somministrare, per via sottocutanea dorsale, al primo gruppo  $1 \times 10^6$  elementi cellulari di *C. caldarium forma A* sospesi in SF emulsionata ad FCA \* nel volume totale di 1 ml per animale. Al secondo gruppo di cinque conigli vengono somministrati, con le medesime modalità,  $2,5 \times 10^5$  cellule di *C. caldarium forma B* in SF + FCA per animale. Vengono quindi eseguite cinque inoculazioni di richiamo, sempre nel sottocutaneo del dorso, a distanza di sette giorni l'una dall'altra. Ogni richiamo consiste nell'inoculazione di  $2 \times 10^6$  cellule di *C. caldarium forma A* nel volume di 1 ml di SF per animale del primo gruppo e di  $5 \times 10^5$  cellule di *C. caldarium forma B* nel volume di 1 ml di SF per ogni animale del secondo gruppo. Trascorsi sette giorni dall'ultimo richiamo tutti gli animali, in anestesia, vengono salassati fino alla morte mediante puntura cardiaca. I sieri vengono centrifugati a freddo e conservati a  $-20^\circ\text{C}$ . Prima dell'uso le aliquote da utilizzare per la prova giornaliera vengono centrifugate a  $15000 \text{ rpm} \times 30 \text{ min}$ .

*Elettroforesi.* Una prima valutazione quantitativa sulla risposta all'immunizzazione è stata ottenuta sottoponendo i sieri normali, quelli degli animali del primo gruppo e quelli degli animali del secondo gruppo, da soli ed uniti in pool, ad elettroforesi, mediante apparecchiature della ditta Gelman.

*Agglutinazione.* La tecnica è quella descritta da STAVITSKY (1954) e da STAVITSKY e ARQUILLA (1958) per le emazie di montone tannate e sensibilizzate. Tale metodica di agglutinazione diretta applicata agli elementi cellulari sottoposti alla nostra indagine, consiste nel porre a contatto, in un adatto sistema di microtitolazione,  $50 \mu\text{l}$  del siero in esame (in diluizioni geometriche scalari in ragione 2, a partire da 1/10) con  $50 \mu\text{l}$  di una sospensione di alghe all'1% in BSA 0,2% in SF. Viene considerato come titolo dell'antisiero la più alta diluizione di quest'ultimo capace di determinare, dopo 24 ore, una agglutinazione di grado ++ (STAVITSKY 1954).

---

\* Gli adiuvanti sono sostanze impiegate in Immunologia per incrementare la risposta anticorpale.

## RISULTATI

La valutazione elettroforetica dell'ammontare in gamma-globuline nei sieri in esame indica una quantità pari a g 9,9/100 ml per il pool dei sieri normali (media aritmetica: g 8,3), g 18,5/100 ml per i sieri degli animali trattati con il *C. caldarium forma A* (m.a.: g. 16,6) ed infine g 10,7/100 ml per i sieri degli animali trattati con il *C. caldarium forma B* (m.a.: g 11,3).

La metodica di agglutinazione diretta si è rivelata adattabile, con gli accorgimenti adottati, soltanto al *C. caldarium forma A*. Infatti i sieri anti forma A, saggiati come tali, forniscono mediamente una risposta positiva contro il proprio antigene fino alla diluizione di 1/160.

I medesimi sieri, cimentati contro il proprio antigene dopo adsorbimento con il *C. caldarium forma B* al 10 %, danno una risposta sovrapponibile a quella della precedente prova. Dopo l'adsorbimento con *C. caldarium forma A* al 10 %, invece, i sieri anti forma A rispondono soltanto fino alla diluizione di 1/40.

Infine i sieri anti forma A, cimentati con il *C. caldarium forma B*, danno una risposta completamente negativa.

Per quanto riguarda i sieri anti forma B si è dovuto constatare che i risultati, per quanto univoci, non sono di facile interpretazione per la scarsa intensità della risposta rispetto alla sensibilità della metodica.

L'unico risultato obiettivamente valido riguarda la risposta di tali sieri anti forma B cimentati contro il *C. caldarium forma A*; essa corrisponde mediamente alla positività fino alla diluizione di 1/20.

## DISCUSSIONE

Tenuto conto dello scopo delle indagini oggetto del presente lavoro preliminare, i risultati, pur non corrispondendo del tutto alle aspettative, possono essere considerati positivi.



Indubbiamente la scarsa sensibilità presentata dalle alghe che abbiamo denominato *Cyanidium caldarium forma B* e la possibilità che la risposta immunologica degli animali vari notevolmente al variare del metodo di sensibilizzazione sono fattori che, in un lavoro non di primo approccio, dovremmo considerare negativi. L'interpretazione dei risultati a nostra disposizione fornisce però indicazioni essenziali al proseguimento delle indagini.

Ad esempio, la diversità nell'ammontare in gamma-globuline tra i sieri ottenuti da animali trattati con *C. caldarium forma A* e con *C. caldarium forma B* (16,6 g/100 ml contro 11,3 g/100 ml) sembrerebbe indicare un potere antigenico, almeno se valutato quantitativamente, diverso.

Inoltre la risposta all'agglutinazione diretta dei sieri ottenuti da animali trattati con *C. caldarium forma A* adsorbiti con *C. caldarium forma B* si mantiene positiva fino ad una diluizione di 1/160; quando invece l'adsorbimento, sia pure non totale, viene eseguito con *C. caldarium forma A*, la risposta decresce fino alla positività soltanto con sieri diluiti 1/40. Tutto lascia ritenere che un adsorbimento eseguito non a scopo indicativo, ma spinto a fondo, dovrebbe produrre un ulteriore decremento nella risposta.

Quando infine i sieri ottenuti dagli animali del secondo gruppo vengono cimentati con il *C. caldarium forma A*, la risposta è positiva fino ad una diluizione di 1/20; se la composizione chimica delle pareti cellulari di *C. caldarium forma A* e *C. caldarium forma B* fosse identica, sembrerebbe naturale una risposta più intensa.

In conclusione le prove preliminari oggetto delle presenti indagini inducono a prospettare la non identità nella struttura chimica delle pareti cellulari delle due forme di *C. caldarium* da noi considerate e quindi forse la vicinanza, ma non la corrispondenza tassonomica, del *C. caldarium forma A* e del *C. caldarium forma B*.

I risultati riportati incoraggiano a perfezionare le tecniche immunologiche impiegate allo scopo di ottenere risposte di immunosistemica in problematiche controverse riguardanti la tassonomia di vegetali unicellulari.

### RIASSUNTO

Gli Autori hanno somministrato rispettivamente *Cyanidium caldarium forma A* e *C. caldarium forma B* a due gruppi di conigli, valutandone la risposta immunitaria quantitativamente mediante elettroforesi dei sieri e qualitativamente mediante metodiche di agglutinazione diretta.

L'ammontare in gamma-globuline si è rivelato significativamente diverso nei due gruppi. Anche la qualità degli anticorpi sembra non corrispondere e pertanto indicare una diversità nella composizione chimica delle pareti degli elementi cellulari impiegati.

### SUMMARY

Two groups of rabbits was injected with the unicellular alga *Cyanidium caldarium forma A* and *C. caldarium forma B* respectively.

The immune response was estimated either qualitatively by direct agglutination or quantitatively by electrophoresis.

The amount of  $\gamma$ -globulins response was markedly different in the two groups of rabbits.

Also the quality of the antibodies formed was different; this seems to indicate a different chemical composition of the cell-wall of the algae examined.

### BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. B., 1959. *Studies with Cyanidium caldarium an anomalously pigmented chlorophyte*. Arch. Microbiol., **32**, 270-277.
- BOENZI D., P. DE LUCA, R. TADDEI, 1977. *Fatty acids in Cyanidium*. Giornale Botanico Italiano, **111**, 129-134.
- BROWN R. M., R. N. LESTER, 1965. *Comparative immunology of the algal genera Tetracystis and Chlorococcum*. J. Phycol., **1**, 60-65.
- BROWN R. M., P. L. WALNE, 1967. *Comparative immunology of selected wild types, varieties and mutants of Chlamydomonas*. J. Protozool., **14**, 365.
- CASTALDO R., 1970. *Ultrastruttura di due forme isolate dalle popolazioni di Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler*. Delpinoa, **10-11**, 91-109.
- DE LUCA P., A. MUSACCHIO, R. TADDEI, 1972 a. *Diverso comportamento in eterotrofia delle due forme di Cyanidium caldarium dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, **12-13**, 19-27.

- DE LUCA P., A. MUSACCHIO, R. TADDEI, 1972 b. *Osservazioni sui pigmenti delle due forme di Cyanidium caldarium dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, **12-13**, 115-123.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium?*. Delpinoa, **10-11**, 79-89.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 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.
- GALDIERI A., 1899. *Su di un'alga che cresce intorno alle fumarole della solfatara*. Rend. R. Accad. Sc. Fis. Mat. Napoli, **6**, 160-164.
- GEITLER L., F. RUTTNER, 1935. *Die Cyanophyceen der deutschen limnologischen Sunda Expedition, etc.* Arch. Hydrobiol., suppl. **14**, 371-481.
- MENEGHINI G., 1839. *Nuova specie di alga*. Nuovo Giornale de' Letterati, **39**, 67-68.
- STAVITSKY A. B., 1954. *Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reaction with tannic acid and protein-treated red blood cells*. J. Immunol., **72**, 360.
- STAVITSKY A. B., E. R. ARQUILLA, 1958. *Studies of protein and antibodies by specific hemagglutination and hemolysis of protein-conjugated erythrocytes*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **13**, 1.
- TILDEN J., 1910. *Minnesota algae*. Minneapolis.