

**Ricerche comparate sui fenomeni di permeabilità
ed accumulo di diacromi e fluorocromi vitali
in due specie di *Bangia* viventi
in condizioni ecologiche diverse (*).**

INTRODUZIONE

Il problema della permeabilità, intrabilità e dell'accumulo di diacromi e fluorocromi vitali, specialmente basici e neutri, nelle cellule delle alghe è stato già preso in esame da AA. diversi e studiato in un numero limitato di specie, sia marine che di acqua dolce, appartenenti a gruppi sistematici diversi. I dati sperimentali rilevati fino ad oggi sono, non solo insufficienti, ma talora anche in contrasto, particolarmente per le alghe marine, con quelli già acquisiti per le cellule delle piante superiori.

Le alghe di acqua dolce, come alcune Desmidiaceae, certe Coniugatae, Diatomeae (HÖFLER e SCHINDLER, 1955), Characeae (HONSELL, 1957) e altre, hanno normalmente un comportamento non molto dissimile da quello tipico delle cellule epidermiche delle tuniche bulbari di *Allium cepa*, sul quale si sono basate e si basano la maggior parte delle ricerche e delle teorie sulle colorazioni vitali (STRUGGER, 1949; DRAWERT, 1956).

(*) Lavoro eseguito con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito del Comitato Biologia e Medicina, Gruppo « ECOLOGIA », presso gli Istituti Botanici di Napoli (Facoltà di Scienze) e Portici (Facoltà di Agraria).

È ormai chiaramente dimostrato che i coloranti vitali e, comunque, anche tutte le sostanze che hanno analoghe caratteristiche chimiche e chimico-fisiche, diffondono dall'ambiente esterno nelle cellule vive soltanto allo stato di molecole indissociate, solubili nei componenti lipidici del plasmalemma e poi si ripartiscono nelle diverse strutture cellulari protoplasmatiche secondo specifiche modalità di accumulo. I coloranti basici e in certi casi anche quelli neutri passano rapidamente nel vacuolo dove possono concentrarsi secondo varie modalità:

a) *trappola ionica*, nei succhi vacuolari vuoti (« leere Zellsäfte »: HÖFLER, 1947), cioè privi di sostanze che in qualche modo leghino i coloranti: in questo caso l'accumulo è determinato dal fatto che le molecole indissociate del colorante basico, permeabili attraverso plasmalemma, citoplasma e tonoplasto, giungendo nella fase acquosa relativamente acida del vacuolo, vi si dissociano e quindi come ioni idrofili non possono più diffondere all'esterno;

b) *combinazione chimica* dei coloranti con determinate sostanze (flavonoidi e tannini) nei succhi vacuolari « pieni » (HÖFLER, 1947), con la conseguente comparsa di una colorazione metacromatica negativa (KINZEL, 1958; KINZEL e BOLAY, 1961);

c) *adsorbimento* dei coloranti a sostanze vacuolari, per lo più di natura pectica, con comparsa di una colorazione metacromatica positiva (HONSELL, 1965).

Nel primo caso (trappola ionica), l'accumulo avviene sempre in forma diffusa in tutto il succo vacuolare, mentre negli altri due casi possono anche manifestarsi fenomeni di smiscelamento con separazione di sferette nella massa colloidale omogenea.

Oltre che un accumulo vacuolare, le cellule delle alghe di acqua dolce e quelle delle piante superiori possono presentare anche fenomeni di accumulo di coloranti basici e neutri nel plasma fondamentale (DRAWERT, 1951; HÖFLER, 1951; STRUGGER, 1940; TOTH, 1952), nei plastici (STRUGGER, 1937; DRAWERT, 1954), nei mitocondri (BRENNER, 1953; DRAWERT, 1953, 1956) e negli

sferosomi (DRAWERT, 1952, 1953, 1955). Le colorazioni vitali che così si manifestano hanno sempre carattere omogeneo e non si osservano fenomeni di smescolamento nè colorazioni metacromatiche negative, ad eccezione del caso dei mitocondri nei quali i fenomeni sembrano essere più complessi. I coloranti si concentrano in queste strutture per un semplice fenomeno di liposolubilità e sono più o meno facilmente dilavabili; in genere non determinano con la loro presenza nella cellula viva alterazioni morfologiche o fisiologiche.

Nelle alghe marine studiate fino ad oggi, sono state osservate variazioni o deviazioni, più o meno accentuate, sia dei fenomeni di permeabilità che di intrabilità ed accumulo dei coloranti basici e neutri: così certe *Cladophora* marine presentano una grande capacità di accumulo della rodamina B nei plastidi (con una considerevole differenza quantitativa rispetto all'analogo fenomeno che si riscontra nelle piante superiori), mentre in *Bryopsis* è molto intenso l'accumulo plasmatico e scarso quello plastidiale (HÖFLER, URL e DISKUS, 1956). *Bryopsis* e *Derbesia* hanno la singolare proprietà di accumulare fortemente nel plasma coloranti basici secondo un dinamismo per il quale si passa da una colorazione citoplasmatica uniforme alla separazione di sferette colorate e, infine, alla precipitazione del colorante sotto forma di aggregati cristallini (HONSELL, 1957, 1960, 1962; HÖFLER, 1963); inoltre, sempre in queste specie, la caffeina determina, in vivo, una notevole imbibizione del citoplasma, modificando ed accelerando i fenomeni dell'accumulo dei coloranti basici (HONSELL, 1961). Anche in diverse alghe rosse le cellule più giovani hanno la proprietà di accumulare i coloranti basici nel citoplasma, spesso molto intensamente, sia allo stato diffuso che in forma di precipitati, i quali, a quanto sembra, non interferiscono con l'attività cellulare (HÖFLER, 1961). Lo stesso fenomeno è stato osservato da TRIPODI (1964) in *Bangia fuscopurpurea* per l'accumulo plasmatico del diacromo basico rosso neutro. Ancora, in alcune Diatomee marine come *Biddulphyia* e *Rhizosolenia* si osserva, sempre in vivo, un accumulo nucleare molto intenso ma facilmente dilavabile, dovuto presumibilmente ad un fenomeno di lipofilia (HÖFLER e HÖFLER, 1964).

Meno sensibili sono invece le variazioni che si riscontrano nelle colorazioni vacuolari delle alghe marine: nelle specie citate i succhi vacuolari sono, per lo più, « succhi vuoti », ma l'intensità dell'accumulo dei coloranti basici con il meccanismo della trappola ionica è molto debole; per i succhi vacuolari pieni, nei pochi casi finora descritti, si riscontrano molte affinità con quanto è stato osservato nelle alghe di acqua dolce e nelle cellule delle piante superiori.

Questo particolare comportamento della maggior parte delle pur poche specie di alghe marine finora studiate dovrebbe far pensare o alla presenza nelle loro cellule, e soprattutto nel citoplasma, di sostanze che hanno un'elevata affinità per i coloranti basici e neutri, ma che non esistono o, eventualmente, sono presenti in quantità trascurabili nelle cellule delle alghe di acqua dolce e delle piante superiori, oppure al fatto che i costituenti colloidali cellulari abbiano caratteristiche chimiche o chimico-fisiche sensibilmente differenti; non è tuttavia da escludere che su eventuali differenze di natura chimico-fisica dei colloidi plasmatici non influisca l'ambiente marino nel quale queste alghe vivono.

Indubbiamente, l'acqua marina esplica un'azione sensibile sui coloranti in essa disciolti, determinando una regressione nella loro dissociazione (HONSELL, 1962) e modificando il loro coefficiente di ripartizione fra fase idrofila e fase lipofila, rispetto a quanto avviene in acqua dolce o nelle soluzioni tamponate M/150 usate normalmente per questo tipo di ricerche con materiali non marini. Di conseguenza, dato che la maggior parte dei fenomeni di permeabilità, intrabilità ed accumulo dipendono anche da questi fattori (e spesso in maniera determinante), è indispensabile che negli studi e nelle ricerche di questo tipo su vegetali marini, non solo se ne tenga conto, ma anche si cerchi di interpretare fino a qual punto essi possano influire sui singoli aspetti di ogni specifica forma di accumulo.

Una delle principali ragioni del nostro lavoro è proprio la ricerca di una soluzione a questo problema e a tal fine sono state scelte due specie di *Bangia*, delle quali una è marina e l'altra di acqua dolce: come rileveremo in seguito, esse pre-

sentano tali e tante affinità morfologiche e fisiologiche che, molto probabilmente, sono da considerare soltanto come due forme molto vicine di una stessa specie, pur avendo un habitat differente. Ovviamente, l'ideale per uno studio sull'influenza dell'acqua marina sulle colorazioni vitali sarebbe stato quello di trovare una specie che da un lato presentasse evidenti segni di accumulo citoplasmatico di coloranti basici e dall'altro che avesse un'ampia valenza ecologica, tale da poter vivere indifferentemente in acqua marina e in acqua dolce. Nostre ricerche in questo senso, orientate particolarmente su forme di acqua salmastra, hanno avuto, fino ad ora, esito negativo. Osservazioni preliminari su queste due specie di *Bangia* ci hanno indicato l'interesse della ricerca e la possibilità di avere una risposta, sotto qualche aspetto anche molto esauriente, ai nostri quesiti.

MATERIALE E METODO

a) Osservazioni sistematiche ed ecologiche. — Oggetto delle nostre ricerche sono state due Bangiales molto affini tra di loro, *Bangia atropurpurea* Roth di acqua dolce e *B. fuscopurpurea* (Dillw.) Lyngb., marina. I loro caratteri morfologici sono identici, tanto che DE TONI (1924), pur considerandole come due specie indipendenti (in un primo tempo aveva ritenuto la prima come una varietà della seconda) le distinse soltanto per la loro diversa ecologia e questo punto di vista è stato pienamente accettato anche dagli AA. posteriori che si sono occupati dell'argomento.

Le nostre osservazioni, estese anche allo studio citologico, confermano l'assenza di caratteri morfologici distintivi: la forma e la dimensione delle singole cellule, l'aspetto dei cromatofori, lo spessore della guaina, il portamento dei talli, la loro costituzione e la differenziazione fra le porzioni basali e terminali, le cellule rizoidali, etc. non presentano alcuna diffe-

renza rilevabile, tanto che le due specie non possono essere distinte in base a questi caratteri. Anche per quanto concerne l'ecologia, a parte il fatto che l'una vive in acque dolci e l'altra in acque marine, analizzando gli altri fattori ambientali delle stazioni nelle quali è stato osservato e raccolto il nostro materiale, abbiamo rilevato che la maggior parte di essi presenta singolari concordanze.

Bangia fuscopurpurea è molto diffusa nella nostra regione su tutte le coste rocciose nei posti particolarmente battuti dell'esolitorale, secondo la classificazione dei livelli di vegetazione di FELDMANN (1959), fin dove giungono gli spruzzi delle onde. Ha una elevatissima resistenza alle variazioni di salinità (BIEBL, 1939), in quanto può passare in breve tempo da un ambiente molto povero di sali, per es. durante le piogge, ad uno quasi saturo, quando, per l'irradiazione solare, ha luogo una forte evaporazione dell'acqua marina che imbeve i suoi talli o che rimane raccolta nelle concavità degli scogli dove essa vive.

Bangia atropurpurea ha un habitat non molto dissimile; sui sassi dei ruscelli montani, ora emersa, ora immersa, molto abbondante nelle cascate e in particolare ai margini di esse, dove le rocce sono alternativamente bagnate dagli spruzzi dell'acqua. Tipico è il caso delle stazioni descritte da PREDA (1908), molto frequenti allora lungo i fiumi e i torrenti, rappresentate dalle ruote dei mulini ad acqua, le cui pale erano abbondantemente ricoperte da fitte popolazioni di *B. atropurpurea*.

Ciò conferma, unitamente alle altre osservazioni sopra descritte, la comune particolare esigenza ecologica delle due *Bangiae* di vivere in acque, sia dolci che marine, sempre abbondantemente aeree. Alcune prove fatte in laboratorio coltivando colonie di *Bangia* in recipienti con acqua ferma e altre in acqua ben agitata, hanno effettivamente dimostrato che nel secondo caso esse vivono meglio e molto più a lungo. Non è improbabile che *Bangia* abbia un metabolismo molto attivo e che gli scambi gassosi con l'ambiente in cui vive siano molto intensi, superiori a quanto sia permesso dalla velocità di diffusione dell'ossigeno e forse anche dell'anidride carbonica in acqua ferma, sia marina che dolce.

B. fuscopurpurea presenta il suo massimo sviluppo durante i mesi invernali: essa compare abbondante nel tardo autunno, quando la temperatura dell'acqua scende al di sotto dei 16-18°C e vegeta tutto l'inverno per scomparire lentamente verso aprile-giugno, in rapporto alle diverse condizioni climatiche stagionali. Più variabile è il comportamento di *B. atropurpurea*, legato certamente alle differenti condizioni termiche delle acque continentali. La vegetazione di *Bangia* è comunque particolarmente abbondante nelle acque fresche e correnti: pur non avendo dati precisi, riteniamo che anche *B. atropurpurea* tenda ad andare a riposo quando la temperatura sale al di sopra dei 20°C.

Entrambe le specie sono molto sensibili ad eventuali variazioni di pH del mezzo ambiente. In tutte le stazioni da noi studiate, sia marine che di acqua dolce, il pH ambientale è molto uniforme e non si discosta molto da un valore medio di 7,8. Prove sperimentali con le soluzioni tamponate che poi avremmo usato per le colorazioni in vivo ci hanno indicato che entrambe le specie hanno una scarsissima resistenza ad una reazione acida del mezzo, tanto che già a pH 5 compaiono, nella maggior parte delle cellule, manifestazioni di necrosi.

Il materiale sul quale sono state fatte le nostre osservazioni e ricerche è stato raccolto, per quanto concerne *B. fuscopurpurea*, sulle scogliere della costa tra il porticciolo di Portici e quello di Torre del Greco nel golfo di Napoli, mentre *B. atropurpurea* è stata raccolta nel Salernitano, ai margini di una cascatella di un affluente del Tusciano, nei pressi di Acerno, a circa m 700 sul livello del mare.

b) Tecniche applicate nella ricerca. — Gli studi citofisiologici su *Bangia* sono stati da noi eseguiti con i metodi delle colorazioni vitali (STRUGGER, 1949; DRAWERT, 1956; HONSELL, 1965) impiegando i diacromi basici rosso neutro, blu di toluidina, blu nilo e il fluorocromo neutro rodamina B. Le soluzioni coloranti, a concentrazioni variabili da 1:2.000 a 1:50.000, sono state preparate in tamponi fosfatici M/150 in acqua distillata a diversi valori di pH per le ricerche su *B. atropurpurea*, mentre per *B. fuscopurpurea* sono state fatte in acqua di mare

filtrata, il cui pH veniva variato, secondo le necessità, con la aggiunta di piccole quantità di HCl N/10. Il materiale è stato colorato con le varie soluzioni per tempi standardizzati di 10 minuti e osservato direttamente al microscopio dopo un breve lavaggio in soluzioni tamponate allo stesso valore di pH di quelle coloranti. Per le osservazioni in fluorescenza abbiamo alternativamente usato luce eccitatrice ultravioletta o blu ottenuta da una lampada a vapori di mercurio ad alta pressione opportunamente filtrata.

Dopo ogni esperimento abbiamo controllato la vitalità delle singole cellule col metodo plasmometrico. Per l'analisi del tipo di accumulo dei coloranti basici, oltre al controllo visivo dei fenomeni metacromatici (KINZEL, 1958), abbiamo usato la reazione dell'ammoniaca (HÖFLER, 1947, 1948): questa sostanza, infatti, se sufficientemente diluita, diffonde rapidamente nelle cellule senza alterare la loro vitalità e modifica, almeno per un certo tempo, il pH del succo vacuolare, del citoplasma e di alcuni suoi costituenti, determinando, per i coloranti basici eventualmente accumulati, una variazione del loro stato di dissociazione e quindi anche della loro solubilità. Infine, abbiamo usato la caffeina (soluzioni allo 0,5 %) per rilevare la presenza, nei diversi costituenti cellulari, di sostanze di tipo tannico, le quali reagiscono normalmente con i coloranti basici provocando fenomeni di metacromasia e smescolamenti colloidali (FLASCH, 1955; HONSELL, 1961).

Tutti i fenomeni osservati e descritti nel presente lavoro sono stati ampiamente controllati, sia con il confronto diretto e contemporaneo di identico materiale non trattato, sia per quanto concerne la loro riproducibilità.

PARTE SPERIMENTALE

1) Ricerche su *Bangia atropurpurea*

a) Colorazione col rosso neutro. — Una prima serie di ricerche orientative, fatte con lo scopo di controllare princi-

palmente la capacità di permeazione e di accumulo del rosso neutro nelle singole cellule e la loro resistenza alle soluzioni tamponate, ha fatto rilevare, soprattutto ai bassi valori di pH, la frequente comparsa di fenomeni necrotici, con colorazione molto intensa su tutta la massa protoplasmatica. Dato che in ambiente acido il rosso neutro è completamente ionizzato e non può pertanto penetrare nella cellula finchè essa è viva, la colorazione dei protoplasti in queste condizioni è da considerare esclusivamente come un fatto secondario, mentre l'azione necrotizzante deve essere necessariamente attribuita all'acidità delle soluzioni. Un controllo in questo senso ha dimostrato che se le cellule vengono immerse per breve tempo in un tampone M/150 a pH 2,8, quasi tutte muoiono rapidamente con una caratteristica contrazione dei protoplasti. A pH 4,8 la resistenza è migliore, ma ancora un'elevata percentuale dei filamenti presenta cellule necrotiche: da rilevare che queste variazioni di resistenza interessano, per lo più, non singole cellule di uno stesso filamento, ma filamenti interi. Al di sopra di pH 6 non si osservano più manifestazioni di questo genere.

I fenomeni di permeabilità e di accumulo del rosso neutro nelle cellule di *B. atropurpurea* sono stati studiati con soluzioni coloranti tamponate ai seguenti valori di pH:

2,8. — La *guaina* (1) generalmente non lega il rosso neutro ma talora può presentare una colorazione violetta (metacromatica negativa) di debole intensità, la quale dimostra la presenza di una sostanza che si combina col colorante dando un composto molto stabile. La *parete cellulare* vera e propria si colora invece molto intensamente con metacromasia positiva

(1) Nel genere *Bangia* i talli filamentosi sono sempre circondati da una *guaina* esterna alla parete cellulare vera e propria, di struttura fibrillare (HONSELL, 1963), non deformabile, mentre la porzione più esterna della parete, presumibilmente di natura pectica, può modificare facilmente, per imbibizione, il suo volume. Infatti, quando le cellule plasmolizzano, la guaina non modifica il suo aspetto, mentre la parete si imbibisce fortemente, rimanendo aderente, con la sua parte più interna, al protoplasto che si contrae. Non è da escludere che esista un rapporto tra questa particolare costituzione della guaina e della parete con la elevata resistenza osmotica di queste cellule.

(rosso fragola) per un fenomeno di adsorbimento dei cationi colorati a cariche negative libere della parete stessa, presumibilmente appartenenti ai suoi costituenti pectici, come si può dedurre dal fatto che immergendo il materiale colorato in una soluzione diluita di CaCl_2 o fortemente diluita di ammoniaca avviene l'immediata liberazione del rosso neutro che passa nella soluzione esterna. Il *protoplasto*, come si è detto sopra, non resiste all'acidità della soluzione e appare sempre molto coartato, fortemente colorato e non vitale (Tav. I, fig. 6).

4,9. — La *guaina* presenta lo stesso aspetto del caso precedente ma la *parete cellulare* è colorata molto intensamente. In qualche caso abbiamo osservato, in materiale preventivamente plasmolizzato, una leggera colorazione diffusa del *citoplasma* o anche la presenza in esso di poche sferette di separazione con colorazione metacromatica negativa. La scarsa entità di queste colorazioni citoplasmatiche e il fatto che si osservano in un numero limitato di cellule, dimostrano che questo valore rappresenta il limite inferiore del pH al quale comincia la penetrazione del rosso neutro: infatti, data la sua costante di dissociazione, a pH 4,9 sono presenti in soluzione soltanto poche molecole indissociate che possono passare attraverso il plasmalemma. I *cromatofori* e il *succo vacuolare* non presentano alcuna traccia della presenza del colorante.

5,2. — Rispetto al caso precedente si osserva un leggero aumento delle sferette citoplasmatiche e, in certe cellule, talora una debole colorazione vacuolare. Trattando il materiale con una soluzione molto diluita di ammoniaca ha luogo la decolorazione della parete e le sferette di separazione del citoplasma modificano il loro aspetto divenendo granulose (si ha forse un fenomeno di precipitazione).

6,0. — La *guaina* è sempre incolore e la *parete* ha una capacità di accumulo ridotta. Nel *citoplasma* sono molto abbondanti le sferette di separazione con colorazione metacromatica negativa (violetta), molto simile a quella che si osserva nei succhi vacuolari « pieni ». Le sferette all'inizio sono molto piccole e man mano confluiscono fra di loro: per permeazione di ammoniaca assumono un aspetto granuloso (Tav. I, fig. 4)

e spesso si osservano nel citoplasma precipitazioni cristalline di rosso neutro. I *vacuoli* si colorano debolmente col meccanismo dell'accumulo ionico.

7,2. — *Guaine e pareti* non colorate; molto evidenti e numerose nel *citoplasma* le sferette di separazione, più o meno grandi e una colorazione diffusa color rosso fragola. La reazione dell'ammoniaca è positiva; per le sferette viene riconfermata la modificazione morfologica già descritta, mentre il citoplasma si decolora completamente. I *vacuoli* presentano un accumulo variabile di tipo ionico, fatto confermato dalla decolorazione per alcalinizzazione con la reazione dell'ammoniaca. Anche i *cromatofori* assumono il colorante in quantità relativamente abbondanti e reazione metacromatica positiva.

7,8. — Il quadro dell'accumulo è lo stesso del caso precedente. L'alcalinizzazione con l'ammoniaca determina la completa decolorazione di tutte le parti della cellula, sia per diffusione del colorante all'esterno, sia per la sua precipitazione cristallina nella cellula stessa. A questo valore di pH, che corrisponde a quello dell'ambiente naturale, abbiamo fatto un maggior numero di osservazioni, sia su materiale appena raccolto, che coltivato in laboratorio, rilevando una grande uniformità nei fenomeni della permeazione e dell'accumulo. Soltanto nei carpogoni abbiamo notato differenze di ordine quantitativo, particolarmente per quanto concerne la presenza delle sferette di separazione nel citoplasma, che qui sono di maggiori dimensioni e in minor numero. La colorazione, molto evidente, ha carattere metacromatico negativo, cioè il colorante vi si trova combinato chimicamente con una sostanza citoplasmatica ed è probabile che la separazione di fase sia dovuta proprio alla comparsa di questo nuovo complesso.

Nella tabella I abbiamo sintetizzato gli aspetti dell'accumulo del rosso neutro nelle diverse strutture cellulari di *Bangia atropurpurea*, in rapporto al pH delle soluzioni coloranti.

pH	guaina	parete	citoplasma		cromatofori	vacuoli
			colorazione diffusa	sferette di separazione		
2,8	(+)	+++	—	—	—	—
4,9	—	++	—	(+)	—	—
5,2	—	+	—	++	—	(+)
6	—	(+)	(+)	+++	(+)	+
7,2	—	(?)	+	+++	++	++
7,8	—	—	++	+++	++	++

Tabella I — Ripartizione del rosso neutro nelle cellule di *Bangia atropurpurea* in rapporto al pH della soluzione colorante: +++ accumulo molto intenso, ++ accumulo modesto, + accumulo debole, (+) accumulo debole soltanto in una parte del materiale osservato.

Tutte le colorazioni sono metacromatiche positive (rosso fragola) ad eccezione di quella delle sferette citoplasmatiche che è negativa (violetta).

b) Modificazioni citoplasmatiche indotte dalla caffeina e sua influenza sull'accumulo del rosso neutro. — Come è noto, la caffeina è uno dei tests per rilevare la presenza di tannini in soluzione. Infatti, queste sostanze, che possono essere di natura diversa (polimeri della leucoantocianina o polimeri misti di flavonoidi), danno precipitati in presenza di caffeina o di altri alcaloidi. La reazione, data la facile permeazione della caffeina, può essere indotta nella cellula vegetale viva ed è caratterizzata dalla comparsa di sferette di separazione in seno al succo vacuolare (STRUGGER, 1949; FLASCH, 1955). Un fenomeno analogo, ma nel citoplasma, è stato finora descritto soltanto in *Bryopsis* (HONSELL, 1962): esso è reversibile, dato che avviene con una certa dinamica, in conseguenza della quale, dopo una fase di confluenza delle sferette in altre più grandi, si giunge al ripristino delle condizioni iniziali.

Le ricerche su *Bangia* sono state fatte con soluzioni di caffeina nell'acqua di coltura a pH 7,8 e il materiale, previo con-

trollo del suo stato al microscopio, vi è stato immerso per 10 minuti. La penetrazione della caffeina è rapida e, senza produrre alterazioni visibili sulle cellule, determina nel citoplasma un processo di separazione di sferette (che in certi casi hanno aspetto granulare) le quali sono di solito meno numerose di quelle che si osservano, allo stesso valore di pH della soluzione esterna, in seguito a colorazione col rosso neutro.

Altre prove dell'azione della caffeina su materiale preventivamente colorato col rosso neutro e, quindi, già con sferette di separazione nel citoplasma, hanno dimostrato che in questo caso non avviene più alcuna modificazione citoplasmatica, ma soltanto si osserva che la colorazione metacromatica negativa delle sferette diviene più vivace.

Il trattamento contemporaneo con caffeina e rosso neutro determina un effetto analogo, compaiono cioè sferette di separazione nel citoplasma con colorazione metacromatica negativa.

c) Colorazione con blu nilo. — Le cellule di *Bangia* sono molto sensibili alla presenza di questo colorante, soprattutto in ambiente basico, tanto che, già dopo 10-20 minuti dalla colorazione, compaiono le prime manifestazioni necrotiche, specialmente alle concentrazioni più elevate. Di particolare interesse il rapporto fra resistenza e concentrazione: soluzioni 1:10.000 e 1:20.000 nell'acqua di coltura (pH 7,8) determinano un accumulo immediato molto intenso che provoca una rapida morte della cellula, rilevabile dalla contrazione dei protoplasti. Soluzioni più diluite, al di sotto di 1:40.000 determinano invece un accumulo normale, paragonabile a quello ottenuto col rosso neutro alla concentrazione 1:10.000, sia per quanto concerne l'intensità, che la ripartizione del blu nilo nelle diverse strutture cellulari: in questo caso non si notano fenomeni di tossicità.

Colorando per 10 minuti nei soliti tamponi fosfatici a diversi valori di pH, con concentrazioni del blu nilo a 1:50.000, si ottengono i risultati seguenti:

fino a pH 7. — La *guaina* è incolore mentre la *parete pectica* presenta un accumulo di notevole entità con colorazione metacromatica positiva (blu), facilmente dilavata da una soluzione

diluita di CaCl_2 ; *plasma*, *cromatofori* e *vacuoli* rimangono del tutto incolori.

pH 7,8. — La parete pectica è ancora colorata, ma compaiono nel *citoplasma* numerose piccole sferette di separazione con colorazione metacromatica negativa (verde). Le sferette sono molto più piccole di quelle che si osservano colorando col rosso neutro e talora è visibile una leggera colorazione metacromatica diffusa di tutto il citoplasma. *Cromatofori* e *vacuoli* non assumono il colorante.

pH 9,1. — *Guaina* e *parete* del tutto scolorate: il *citoplasma* presenta due forme di accumulo, una diffusa con colorazione metacromatica positiva e una sotto forma di sferette di separazione citoplasmatiche con colorazione metacromatica negativa. Quest'ultima forma di accumulo è molto stabile mentre la prima scompare dopo un certo tempo. Si nota un accumulo anche nei *cromatofori* (metacromasia positiva) e nel *vacuolo* nel quale avviene col meccanismo della trappola ionica.

d) Colorazione col blu di toluidina. — Dopo aver constatato, nelle prime ricerche orientative, che le modalità di accumulo del blu toluidina, in rapporto ai diversi valori di pH della soluzione colorante esterna, corrispondono perfettamente a quanto descritto per il rosso neutro (tenuto ovviamente conto della loro diversa costante di dissociazione) abbiamo ritenuto opportuno riportare dai nostri protocolli soltanto le osservazioni fatte a pH 7,8, sciogliendo il blu toluidina nell'acqua di coltura alla solita concentrazione di 1:10.000.

La *guaina* è del tutto incolora mentre le pareti, soprattutto quelle divisorie fra cellula e cellula presentano un accumulo evidente ma non molto intenso, dando una colorazione violetta metacromatica positiva: ponendo il materiale colorato nella solita soluzione di CaCl_2 , l'accumulo scompare lentamente confermando, come nei casi precedenti, che esso è dovuto ad un fenomeno di adsorbimento. Nel *citoplasma* compaiono anche in questo caso sferette di separazione, in numero minore di quelle che si osservano col blu nilo: esse sono però molto

più piccole e molto scure, tanto che non è possibile distinguere la loro colorazione (la concentrazione del blu di toluidina deve raggiungere in esse valori piuttosto elevati). Inoltre, non abbiamo notato, come nei casi precedentemente descritti, la coalescenza delle sferette fra di loro. Normalmente, all'inizio, il citoplasma presenta anche una colorazione diffusa uniforme con metacromasia positiva, che va poi lentamente scomparendo, ma senza che il colorante diffonda verso l'esterno. Abbiamo fatto un'analogia osservazione per i *cromatofori*, i quali all'inizio della colorazione presentano un accumulo ben evidente che in seguito diminuisce di entità mentre aumenta quello vacuolare. Si tratta evidentemente di uno spostamento del colorante verso quelle strutture cellulari che hanno una maggiore capacità di accumulo. I vacuoli presentano sempre un'ottima colorazione col meccanismo della trappola ionica: la reazione dell'ammoniaca dà sempre risultati positivi.

Per quanto concerne la resistenza delle cellule di *Bangia* al blu toluidina, possiamo dire che essa è pari a quella al rosso neutro, quindi molto elevata. Una serie di prove con soluzioni di blu toluidina a concentrazioni diverse (1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000) hanno dimostrato una certa indifferenza da parte delle cellule di *Bangia atropurpurea* a questo fattore, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

e) Colorazione con rodamina B. — Come è noto, questo fluorocromo ha una costante di dissociazione molto piccola, tanto che ai valori biologici di pH si trova sempre allo stato indissociato ed ha un carattere spiccatamente lipofilo. Per questa ragione non abbiamo ritenuto necessario osservare l'andamento della colorazione a diversi valori di pH della soluzione esterna ma, anche per avere il materiale nelle migliori condizioni fisiologiche, abbiamo preparato le soluzioni coloranti nell'acqua di coltura, variando le concentrazioni da 1:2.000 a 1:10.000.

La *guaina* e la *parete cellulare* non trattengono la rodamina B, mentre è molto intenso l'accumulo nel citoplasma, il quale presenta una forte fluorescenza giallo oro, di intensità direttamente proporzionale alla concentrazione della soluzione colo-

rante. L'accumulo della rodamina avviene uniformemente in tutto il citoplasma e non ha mai luogo la formazione di sferette di separazione, così frequente ed abbondante con gli altri coloranti basici studiati. Anche i cromatofori assumono il colorante, ma con intensità minore, mentre non si verifica accumulo nel succo vacuolare. La fluorescenza ha sempre carattere metacromatico positivo ed è quindi da escludere la possibilità di una combinazione chimica della rodamina con un qualsiasi costituente cellulare (Tav. I, fig. 1).

Le cellule di *Bangia* non vengono danneggiate dalla presenza della rodamina B, anche alle concentrazioni più elevate e l'accumulo è determinato soltanto dal coefficiente di ripartizione tra la fase idrofila esterna della soluzione colorante e quella lipofila interna, citoplasmatica e del cromatoforo: l'intensità dell'accumulo dipende esclusivamente dalla concentrazione della soluzione esterna. Infatti, dilavando il materiale colorato in acqua pura, la rodamina passa rapidamente all'esterno, come si può facilmente rilevare dalla graduale diminuzione della fluorescenza secondaria delle cellule e della diffusione della rodamina nell'acqua di lavaggio (Tav. I, fig. 2 e 3).

2) Ricerche su *Bangia fuscopurpurea*

Una prima serie di ricerche preliminari sui fenomeni di accumulo dei diacromi basici rosso neutro, blu toluidina e blu nilo nelle cellule di questa specie marina è stata già fatto da uno di noi (TRIPODI, 1964); dato l'interesse dei fatti osservati, abbiamo ritenuto opportuno un ulteriore approfondimento di questi studi.

a) Colorazione col rosso neutro. — Dalle ricerche preliminari di TRIPODI (1964) è risultato che questo colorante, disciolto in acqua marina (pH 7,8) viene accumulato in vivo dal *citoplasma*, dai *cromatofori* e dai *vacuoli*. Interessante l'accumulo plasmatico, per il suo dinamismo: in un primo tempo ha luogo una colorazione diffusa con metacromasia positiva, poi si separano in seno al citoplasma piccole sferette che assumono

una colorazione metacromatica negativa e, infine, mentre le sferette di separazione rimangono invariate, il rosso neutro presente in forma diffusa nel citoplasma precipita in cristalli. Questo ultimo fenomeno viene esaltato in seguito ad alcalinizzazione con una soluzione molto diluita di ammoniaca ed avviene anche nel vacuolo e nei cromatofori. L'accumulo vacuolare, piuttosto modesto, avviene sempre col meccanismo della trappola ionica. Il fenomeno dello smescolamento dei colloidi plasmatici è particolarmente diffuso nelle cellule giovani, mentre si nota raramente nelle cellule dei filamenti pluristratificati, più adulti. Il rosso neutro viene eliminato con facilità dal citoplasma lavando le cellule in acqua marina pura, ma persiste quello accumulato nelle sferette.

Prima di procedere alle osservazioni sull'andamento della permeazione e dell'accumulo di questo colorante con soluzioni tamponate a valori di pH inferiori alla neutralità, abbiamo controllato la resistenza di *Bangia fuscopurpurea* in queste condizioni.

In acqua marina acidulata con HCl N/10 fino a pH 2,8, le cellule, anche dei filamenti più giovani in piena attività di accrescimento, hanno dimostrato di possedere una resistenza molto elevata, che, tuttavia, diminuisce col tempo: infatti, mentre nella prima mezz'ora il materiale non presenta modificazioni morfologiche rilevabili, nella seconda cominciano ad apparire fenomeni necrotici caratterizzati dalla coartazione dei protoplasti e dal loro distacco dalla parete cellulare. Innalzando il valore di pH a 5,1, anche dopo un tempo quattro volte maggiore, non si osservano segni di sofferenza.

pH 2,8. — La *guaina* non assume il rosso neutro, il quale, invece, si concentra fortemente nella *parete pectica*, dando una colorazione metacromatica positiva. La natura di questo accumulo è chiaramente dimostrata dalla reazione positiva ottenuta dal trattamento del materiale colorato con una soluzione di CaCl_2 (1%). I protoplasti vivi non assumono il rosso neutro.

pH 4,1. — I fenomeni osservati sono identici a quelli descritti nel caso precedente ma in qualche cellula può aver luogo anche un accumulo plasmatico di limitata importanza, ca-

ratterizzato dalla comparsa di poche piccole sferette di separazione con colorazione metacromatica negativa rosso-violetta.

pH 5,1. — La *guaina*, come pure normalmente la *parete pectica*, non si colora: fanno eccezione soltanto le pareti delle cellule rizoidali che accumulano il colorante con il meccanismo sopra descritto. Si nota anche un accumulo metacromatico positivo nei *cromatofori* e in forma diffusa nel *citoplasma*, nel quale ultimo, tuttavia, compaiono anche sferette di separazione rosso-violette (metacromasia negativa) (Tav. I, fig. 5).

pH 5,9. — *Guaina* e *parete* non si colorano più; numerosissime, invece, nel *citoplasma* le sferette di separazione e un accumulo diffuso con le stesse caratteristiche indicate nel caso precedente. Talora si osserva anche una debole colorazione vacuolare rosso fragola. Trattando il materiale con una soluzione molto diluita di ammoniaca, scompare la colorazione diffusa del *citoplasma* e del *vacuolo* e il rosso neutro diffonde all'e-



Fig. 1. — Cellule di *Bangia fuscopurpurea* dopo la colorazione con una soluzione di rosso neutro 1:10.000 in acqua di mare a pH 5,9. Si notano nel citoplasma le numerose sferette di separazione colorate con metacromasia negativa (rosso violetto), la cui formazione è stata indotta dalla combinazione del colorante con una sostanza citoplasmatica di probabile natura polifenolica. (ingr. 1500 x).

sterno o precipita sotto forma di piccoli cristalli. Le sferette di separazione presenti nel citoplasma conservano invece la loro colorazione e non subiscono variazioni (fig. 1). Si nota anche un accumulo nei cromatofori, facilmente dilavabile.

pH 7,8. — I risultati delle osservazioni concordano con quelli già descritti da TRIPODI (1964), riassunti all'inizio.

I diversi aspetti dell'accumulo del rosso neutro nelle cellule di *Bangia fuscopurpurea* vengono sintetizzati in tabella 2.

pH	guaina	parete	citoplasma		cromatofori	vacuoli
			colorazione diffusa	sferette di separazione		
2,8	—	+++	—	—	—	—
4,1	—	+	—	(+)	—	—
5,1	—	(+)	(+)	+++	+	—
5,9	—	—	+++	+++	+++	+
7,8	—	—	+++	+++	+++	++

Tabella II — Accumulo del rosso neutro nelle diverse strutture cellulari di *Bangia fuscopurpurea* dopo colorazione in soluzioni di acqua di mare a diversi valori di pH, ottenuti per piccole aggiunte di HCl N/10: +++ accumulo molto intenso, ++ accumulo modesto, + accumulo debole, (+) accumulo debole soltanto in una parte del materiale osservato.

Le colorazioni hanno tutte carattere metacromatico positivo (rosso fragola), ad eccezione di quelle delle sferette di separazione del citoplasma le quali, invece, sono metacromatiche negative (violetto).

b) Influenza della caffeina sui fenomeni di accumulo del rosso neutro. — Gli esperimenti sono stati fatti con soluzioni di caffeina M/20 e di rosso neutro 1:10.000 in acqua di mare a pH 7,8, lo stesso dell'acqua di coltura.

Un primo trattamento delle cellule in soluzione di caffeina per 10 minuti non ha portato ad alcuna reazione visibile: in particolare il citoplasma, osservato al microscopio ottico in luce trasmessa e in contrasto di fase con il massimo ingrandimento possibile (con obiettivo apocromatico ad immersione

100 x), si presenta con lo stesso identico aspetto nelle cellule trattate e nel materiale di controllo, tanto che è da escludere la formazione di sferette di separazione di dimensioni visibili con questo mezzo di indagine. Non è possibile tuttavia stabilire se il carattere negativo di questa reazione, che invece è positiva per *B. atropurpurea*, sia dovuto ad una differente costituzione plasmatica o piuttosto alla mancata permeazione della caffeina, dato che non abbiamo la possibilità di stabilire se questa sostanza ha la capacità, nelle condizioni sopra indicate, di penetrare nel protoplasto.

Trattando le cellule con soluzione di rosso neutro + caffeina, nelle concentrazioni sopra indicate, si nota, in confronto a materiale colorato per lo stesso tempo con solo rosso neutro, una forte inibizione nella permeazione del colorante, del quale si rilevano soltanto alcune tracce nel succo vacuolare, dovute ad un accumulo del tipo della trappola ionica, come si può facilmente dimostrare con la reazione dell'ammoniaca.

Se, infine, il materiale viene posto prima in una soluzione di caffeina (10 minuti) e poi passato per lo stesso tempo in una soluzione colorante di rosso neutro, si nota soltanto una riduzione quantitativa dei fenomeni di accumulo del colorante. Alcalinizzando i protoplasti con una soluzione molto diluita di ammoniaca, avviene una rapida decolorazione del succo vacuolare e del citoplasma, ad eccezione delle sferette di separazione plasmatiche, la comparsa delle quali è stata indotta dalla presenza del colorante, e che persistono inalterate.

Dato il carattere particolare di queste reazioni, abbiamo ripetuto più volte ed in periodi diversi i nostri esperimenti, ottenendo sempre gli stessi risultati.

c) *Colorazione con blu nilo*. — La tossicità del blu nilo, colorante basico fortemente lipofilo, era già stata segnalata nelle precedenti ricerche di TRIPODI (1964) su questa stessa specie ed è stata pienamente confermata dalle nostre osservazioni, anche con soluzioni coloranti a valori di pH più bassi, ai quali sono presenti in soluzione prevalentemente ioni colorati non permeabili. Con soluzioni coloranti alla concentrazione 1:10.000 abbiamo ottenuto i seguenti risultati: fino a pH 5,5 il colorante,

essendo completamente dissociato, non penetra nei protoplasti ma si accumula fortemente nella *parete*, in maniera particolarmente intensa in quella delle cellule rizoidali, dove i cationi del blu nilo vengono legati con lo stesso meccanismo descritto per il rosso neutro: la reazione di sostituzione con Ca^{++} è positiva. A pH 6,5, essendo presenti, sia pure in minima percentuale, molecole indissociate permeabili, si nota un rapido accumulo nelle strutture cellulari maggiormente lipofile come i *cromatofori*. Contemporaneamente appaiono nel *citoplasma* le solite sferette di separazione, colorate molto intensamente. A valori più elevati di pH della soluzione colorante, l'accumulo nei *cromatofori* è talmente intenso da modificare la loro forma e i *protoplasti* mostrano, dopo breve tempo, evidenti fenomeni necrotici, caratterizzati principalmente dalla coartazione di tutte le cellule. Data l'intensità dell'accumulo del blu nilo non è possibile distinguere l'aspetto metacromatico delle sue colorazioni.

Con soluzioni coloranti più diluite (1:50.000) si ottengono, invece, risultati perfettamente paragonabili a quelli descritti per il rosso neutro. Abbiamo brevemente ripetuto gli esperimenti già fatti da TRIPODI (1964) confermandone pienamente i risultati: a pH 7,8 la *guaina* e la *parete* non assumono più il colorante, nel *citoplasma* si osserva una colorazione diffusa violetta (metacromasia positiva) e la separazione di sferette blu-verdi (metacromasia negativa) (Tav. I, fig. 7). Il *cromatoforo* è anche sede di intenso accumulo con colorazione violetta e il succo cellulare concentra il colorante col solito meccanismo della trappola ionica. A questi valori di concentrazione della soluzione colorante non si osservano manifestazioni di insofferenza al blu nilo o fenomeni necrotici e le cellule conservano il loro aspetto normale e rimangono perfettamente vitali.

d) *Colorazione col blu toluidina*. — Dopo aver riconfermato i dati ottenuti da TRIPODI (1964), abbiamo esteso lo studio della permeabilità e della ripartizione di questo colorante nelle cellule di *B. fuscopurpurea*, impiegando soluzioni coloranti tamponate anche a valori di pH inferiori a quelli dell'acqua di mare (7,8). Per l'azione dell'acqua di mare sulla dissociazione dei coloranti basici, argomento del quale abbiamo già

ampiamente parlato, il blu toluidina penetra nei protoplasti già a pH 5,7 (in acqua dolce soltanto al di sopra di pH 7), mentre a valori inferiori ha luogo l'accumulo nella parete pectica, con le stesse modalità descritte per il rosso neutro e il blu nilo. Anche il quadro generale dei fenomeni di accumulo e di ripartizione del blu toluidina nei protoplasti vivi, tenuto conto della sua diversa costante di dissociazione, è lo stesso di quello descritto per il rosso neutro. Sempre evidentissima la comparsa di sferette di separazione con colorazione metacromatica negativa in seno al *citoplasma* e costante la sua colorazione diffusa, meno intensa e talora di breve durata, con carattere metacromatico positivo. Il *vacuolo* accumula il blu toluidina col meccanismo della trappola ionica, mentre relativamente intenso è lo accumulo nei *cromatofori*, i quali danno una colorazione metacromatica positiva.

Il controllo della tossicità del blu toluidina, alla solita concentrazione di 1:10.000, ha dimostrato che le cellule colorate non subiscono alterazioni visibili, plasmolizzano e anche dopo molte ore conservano il loro aspetto normale, considerando, ovviamente, come tale, anche la presenza delle sferette di separazione nel citoplasma, determinate dalla permeazione del colorante.

e) *Colorazione con rodamina B.* — Come già è stato detto a proposito delle ricerche con questo fluorocromo su *B. atropurpurea*, date le caratteristiche della sua dissociazione (si ionizza soltanto in soluzioni a valori molto bassi di pH, assolutamente non biologici), non è necessario studiarne la permeazione e l'accumulo nella cellula viva usando soluzioni coloranti tamponate a diversi valori di pH. E' opportuno, invece, variare i valori della sua concentrazione allo scopo di valutarne gli effetti sull'accumulo e sulla ripartizione nelle diverse strutture cellulari viventi.

L'accumulo della rodamina B avviene esclusivamente nel citoplasma e nei suoi costituenti: esso è direttamente proporzionale alla sua concentrazione nella soluzione esterna e necessariamente dipende soltanto dal coefficiente di ripartizione tra fase idrofila e fase lipofila. La prima è rappresentata dalla

soluzione acquosa esterna, la seconda dai costituenti lipofili cellulari. Ponendo le cellule colorate in acqua marina pura, esse si decolorano rapidamente per la diffusione della rodamina verso l'esterno e, sostituendo più volte l'acqua di lavaggio, tutto il colorante viene eliminato.

La rodamina B dà sempre una colorazione e fluorescenza con metacromasia positiva e la sua presenza nella cellula non induce quei fenomeni di smescolamento caratteristici e così costanti del citoplasma, indotti dai coloranti basici. E' difficile stabilire un rapporto quantitativo tra intensità di accumulo nei cromatofori e nel citoplasma: trattandosi di un fluorocromo, la fluorescenza emessa dagli strati più superficiali copre quella delle porzioni cellulari più interne e, quindi, quella citoplasmatica impedisce di valutare obiettivamente quella dei cromatofori sottostanti. Possiamo rilevare soltanto che la fluorescenza primaria dei cromatofori, dovuta alla clorofilla e alle ficobiline, è completamente coperta e nascosta da quella secondaria determinata dall'abbondante presenza della rodamina B in essi e fuori di essi. Il vacuolo non accumula mai il colorante.

Dalle ricerche eseguite con soluzioni coloranti a concentrazioni da 1:500 a 1:20.000 abbiamo rilevato che l'aspetto dell'accumulo non varia qualitativamente e che la sua entità è direttamente proporzionale alla concentrazione della soluzione esterna. Anche le soluzioni più concentrate non hanno alcun effetto tossico, conservando le cellule tutte le loro caratteristiche vitali: esse plasmolizzano normalmente e appena vengono poste in acqua di mare pura, il colorante diffonde rapidamente verso l'esterno.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'esame dei risultati delle nostre ricerche risulta evidente che le cellule di *Bangia atropurpurea* di acqua dolce, non presentano, rispetto a quelle di *B. fuscopurpurea* marina, sensibili differenze qualitative nel loro comportamento, sia per quanto concerne le colorazioni vitali, che per le altre reazioni particolari, come la scarsa resistenza a valori relativamente

bassi di pH del mezzo ambiente o all'alcalinizzazione dei protoplasti con l'ammoniaca o, infine, ai fenomeni indotti dalla permeazione della caffeina.

Il diverso aspetto quantitativo, talora anche rilevante, che invece abbiamo constatato in alcune delle nostre ricerche, è in genere, facilmente interpretabile e si può attribuire a fatti di natura chimico-fisica, in rapporto all'effetto della diversa concentrazione salina delle acque nelle quali vivono, sullo stato di dissociazione delle varie sostanze impiegate negli esperimenti.

Infatti, precedenti ricerche di uno di noi (HONSELL, 1962) hanno dimostrato che coloranti basici, come per es. il rosso neutro, se disciolti in acqua marina, presentano un notevole spostamento della curva di dissociazione verso l'ambiente acido, tanto che il valore del loro pK diminuisce di oltre due unità: ciò comporta che in acqua marina, a valori di pH ai quali, nei tamponi fosfatici M/150 (usati per gli studi di permeabilità dei coloranti sul materiale di acqua dolce) sono normalmente presenti solo ioni, predominano invece le molecole indissociate e, di conseguenza, tutti i caratteristici fenomeni di adsorbimento dei coloranti alle pareti cellulari e quelli relativi alla loro permeazione e al loro accumulo nei diversi costituenti dei protoplasti avvengono, per gli organismi marini, a valori di pH più bassi.

In particolare, se confrontiamo i dati delle due tabelle riassuntive delle colorazioni vitali col rosso neutro in *B. atropurpurea* e *B. fuscopurpurea*, dati che corrispondono, tenuto ovviamente conto della diversa costante di dissociazione, anche per quanto abbiamo osservato nelle nostre ricerche con il blu nilo e il blu toluidina, possiamo facilmente, sulle basi sopra indicate, dare un'interpretazione logica delle differenze riscontrate.

Così, per es., è stato dimostrato (HÖFLER, 1948; KINZEL, 1953) che la parete cellulare adsorbe i coloranti basici come cationi alle cariche negative libere appartenenti ai suoi costituenti pectici e il fenomeno avviene, ovviamente, soltanto se il colorante nella soluzione esterna è presente in forma ioniz-

zata: in *B. atropurpurea* la parete adsorbe il colorante in ambiente acido fino poco al di sopra di pH 5, mentre in *B. fuscopurpurea* marina, questo limite è abbassato a circa pH 4. La dimostrazione che in entrambi i casi la parete cellulare si colora con un meccanismo di adsorbimento è data dal fatto che in entrambe le specie è possibile determinare una reazione di sostituzione dei cationi colorati con un catione bivalente (Ca^{++}).

Il primo segno di accumulo nel protoplasto vivo compare, invece, appena sono presenti in soluzione molecole indissociate del colorante: infatti, come è stato dimostrato da IRWIN (1926), DRAWERT (1938, 1956), HÖFLER (1947), KINZEL (1954) ed altri, i coloranti vitali e, del resto, anche tutte le altre sostanze che non danneggiano i protoplasti e che presentano analoghe caratteristiche chimiche e chimico-fisiche, penetrano nella cellula soltanto sotto forma di molecole indissociate liposolubili, data la natura lipofila del plasmalemma, con un meccanismo di diffusione puramente passivo. In *Bangia atropurpurea* la colorazione diffusa del citoplasma compare intorno a pH 7, in *B. fuscopurpurea*, fra pH 5 e 6, evidentemente in rapporto alla presenza di molecole indissociate del rosso neutro nelle due soluzioni coloranti. Altrettanto si può dire per le sferette di separazione che si formano nel citoplasma, anche se in questo caso le differenze sono meno sensibili, e per l'accumulo vacuolare e plastidiale.

Un altro carattere, sempre di natura chimico-fisica, da tenere presente per l'interpretazione dei fatti osservati, è quello relativo alle caratteristiche di solubilità dei singoli coloranti usati nella ricerca: fra questi, infatti, il rosso neutro, quando è allo stato indissociato, è ben poco idrosolubile e precipita facilmente se le sue soluzioni hanno valori di pH appena superiori alla neutralità, mentre ciò non avviene per il blu toluidina e il blu nilo. Quest'ultimo, d'altra parte, è estremamente lipofilo, tanto che viene normalmente usato per mettere in evidenza particolari strutture cellulari di natura lipidica come gli sferosomi (DRAWERT, 1952, 1953): in conseguenza di questo fatto e forse anche in rapporto con una particolare costituzione lipofila di tutte le strutture cellulari di *Bangia*, per evitare ac-

cumuli eccessivamente intensi e decisamente letali, abbiamo dovuto usarlo a concentrazioni molto più basse (1:50.000) che non gli altri due coloranti basici (1:10.000).

Il fenomeno più appariscente e anche più singolare della colorazione vitale di *Bangia*, che si manifesta in modo perfettamente eguale in entrambe le specie studiate, è dato dall'accumulo citoplasmatico dei coloranti basici e, in particolare, dalla dinamica con la quale avviene. Esso è stato già brevemente descritto da TRIPODI (1964) per *Bangia fuscopurpurea* e rassomiglia molto a quanto è stato osservato di analogo in *Bryopsis* e *Derbesia* (HONSELL, 1957, 1960, 1962; HÖFLER, 1963) e nel citoplasma apicale di tubi pollinici in accrescimento (TRIPODI, 1963). Un fatto del genere non era stato ancora mai descritto per le piante superiori nè per altre alghe marine o di acqua dolce, pur essendo state fatte fino ad oggi numerose ricerche con le colorazioni vitali su un notevole numero di specie. Come abbiamo già sopra descritto e come avviene in *Bryopsis* e *Derbesia*, i coloranti basici rosso neutro, blu nilo e blu toluidina penetrano nelle cellule di *Bangia* sotto forma di molecole indissociate e si accumulano nelle varie strutture cellulari in funzione, soprattutto, della loro concentrazione nella soluzione esterna. Appena ha avuto inizio la permeazione si osserva la comparsa nel citoplasma di piccole sferette di separazione, le quali, per la loro colorazione metacromatica negativa e del resto anche per la loro stessa presenza, indicano che il colorante si è combinato con una qualche sostanza citoplasmatica: l'affinità con analoghi fenomeni che si osservano nei succhi vacuolari pieni (HÖFLER, 1954) ci può far pensare che essa sia di natura polifenolica (PFEFFER, 1886; FLASCH, 1956; KINZEL, 1958). Questo punto di vista, del resto, è pienamente confermato dal fatto che le stesse sferette di separazione compaiono nel citoplasma di *Bangia atropurpurea* dopo permeazione di caffeina, il tipico reattivo in vivo dei tannini (STRUGGER, 1949). A questo proposito è da rilevare, tuttavia, che in *Bangia fuscopurpurea* non abbiamo ottenuto una reazione positiva per i tannini con la caffeina, ma riteniamo che in questo caso, dato l'identico comportamento delle due specie in tutti gli altri nostri esperimenti, la mancata reazione sia probabilmente da mettere in rapporto con un ef-

fetto dell'acqua marina sulla possibilità di permeazione di questa sostanza.

Un'ulteriore differenza di comportamento fra le due specie si riscontra nell'ultima fase dell'accumulo plasmatico dei coloranti basici. Come in *Bryopsis* e *Derbesia* (HONSELL, 1957, 1960, 1962; HÖFLER, 1963), anche in *B. fuscopurpurea* i coloranti accumulati nel citoplasma in forma diffusa e con metacromasia positiva, dopo un certo tempo vi precipitano in forma di piccoli cristalli, mentre persistono le sferette di separazione: ciò, invece, non avviene in *B. atropurpurea* (di acqua dolce), nella quale la colorazione citoplasmatica diffusa scompare dopo breve tempo senza lasciare traccia. Non è da escludere che anche in questo caso le differenze indicate siano da attribuire in qualche modo all'azione dell'acqua di mare sulla dissociazione dei coloranti e di conseguenza sulla loro solubilità: tuttavia, dato che il fenomeno avviene nel citoplasma, la questione, prima di essere definita, richiede un ulteriore approfondimento.

Diverso è il comportamento della rodamina B: questo colorante di carattere basico è praticamente da considerare come neutro ai valori biologici di pH, in quanto la sua dissociazione ha inizio soltanto al di sotto di pH 2 (STRUGGER, 1949). Essa penetra con estrema facilità nelle cellule vive, data anche la sua elevata lipofilia e si accumula normalmente nel citoplasma e nelle altre strutture cellulari in rapporto al loro carattere lipidico e alla sua concentrazione nella soluzione colorante. Infatti, la rodamina B, se le cellule colorate vengono poste in acqua pura, diffonde di nuovo rapidamente verso l'esterno (HONSELL, 1962): l'accumulo è dovuto quindi esclusivamente alla sua ripartizione fra strutture lipofile cellulari e fase idrofila esterna (DRAWERT, 1956). Tuttavia anche la rodamina può combinarsi con sostanze cellulari, dando una colorazione e fluorescenza metacromatiche negative (HÖFLER, 1947, 1949, 1954) e questo è il caso dei succhi vacuolari pieni, nei quali sono presenti sostanze tanniche.

Nelle due *Bangiae* da noi studiate, indipendentemente dal fatto che una sia marina e l'altra di acqua dolce, la rodamina viene fortemente accumulata, per un semplice fenomeno di ri-

partizione fra la fase acquosa esterna e quella protoplasmatica, sia nel plasma fondamentale (o comunque nelle strutture più lipofile di esso) che particolarmente nei cromatofori, ma non si osservano quei fenomeni di smescolamento e di metacromasia negativa indotti dalla presenza degli altri coloranti basici, nè si nota un accumulo vacuolare. Quest'ultimo fatto è facilmente interpretabile perchè, data la non dissociabilità della rodamina nel succo vacuolare, non può aver luogo un accumulo col meccanismo della trappola ionica: l'assenza di fenomeni di smescolamento e della metacromasia negativa in rapporto con essi, deve farci necessariamente pensare che le sostanze plasmatiche che si legano con gli altri coloranti basici e che non possiamo escludere, per le varie ragioni sopra citate, trattarsi di sostanze polifenoliche, abbiano natura chimica e caratteristiche chimico-fisiche diverse da quelle contenute nei succhi vacuolari pieni delle piante superiori e anche di certe alghe di acqua dolce e, quindi, non siano capaci di combinarsi con questo colorante, il quale è senza dubbio, date le sue caratteristiche chimico-fisiche, molto meno reattivo degli altri coloranti basici studiati.

Caratteristico e particolare è il comportamento del blu nilo: questo colorante ha, come si è detto, un'elevata lipofilia (DRAWERT, 1952, 1953) e normalmente viene accumulato in maggiore quantità dai costituenti cellulari che hanno una costituzione fortemente lipidica, come per es. gli sferosomi. Nelle due *Bangia* esso si concentra nel citoplasma in tali quantità da determinare nelle cellule una vera e propria necrosi da accumulo. Il fatto che un abbassamento della concentrazione della soluzione colorante da 1:10.000 a 1:50.000 porti ad una ripartizione del blu nilo nei diversi costituenti cellulari in quantità non dannose e paragonabili a quanto si riscontra con gli altri coloranti basici, ci dimostra che in *Bangia* (e ciò è valido per entrambe le specie) l'accumulo plasmatico in forma diffusa è dovuto semplicemente ad un fenomeno di ripartizione tra fase idrofila esterna e lipofila interna e che quest'ultima è quantitativamente e qualitativamente di particolare rilevanza: ciò è dimostrato, del resto, anche dal notevole accumulo reversibile della rodamina B. Naturalmente, anche con il blu nilo si osser-

vano molto evidenti le sferette di separazione determinate dalla sua combinazione con il costituente plasmatico, la cui natura, come abbiamo già detto sopra, è polifenolica e, anche in questo caso, ciò è nuovamente confermato dalla reazione metacromatica negativa.

Un ultimo fatto, che dà un'ulteriore conferma dell'affinità non solo morfologica ma anche fisiologica fra le due *Bangiae*, è la scarsissima resistenza che le loro cellule presentano alla reazione, anche relativamente acida, del mezzo in cui vivono. Riteniamo che la questione abbia un certo interesse e vada pertanto studiata più a fondo.

Da queste nostre ricerche di citofisiologia comparata in *Bangia atropurpurea* di acqua dolce e *B. fuscopurpurea* marina, possiamo trarre pertanto le seguenti conclusioni:

1. I fenomeni di permeabilità, intrabilità ed accumulo dei coloranti basici rosso neutro, blu toluidina e blu nilo presentano, in generale, nelle due specie, gli stessi identici aspetti qualitativi.

2. Le variazioni quantitative riscontrate in detti fenomeni, nelle due specie, indubbiamente non rilevanti, dipendono soltanto dal fatto che la penetrazione dei coloranti è in diretto rapporto con il loro grado di dissociazione e questo è diverso, allo stesso valore del pH, in acqua dolce e in acqua marina.

3. Il forte accumulo dei coloranti basici nel citoplasma fondamentale e la sua dinamica, fenomeni precedentemente descritti soltanto in *Bryopsis* e *Derbesia* (HONSELL, 1957, 1960, 1962; HÖFLER, 1963) e in *Bangia fuscopurpurea* (TRIPODI, 1964) non hanno nessun rapporto, come si era prospettato nei precedenti lavori sull'argomento, con le modificazioni indotte dall'acqua di mare sui caratteri chimico-fisici dei coloranti, ma dipendono, come è chiaramente dimostrato dall'identico comportamento delle due *Bangiae*, pur essendo una marina e l'altra di acqua dolce, da un carattere specifico del citoplasma fondamentale delle loro cellule, non molto diverso da quello presentato da *Bryopsis* e *Derbesia*.

4. Un aspetto di questo carattere particolare del citoplasma è dato dalla sua elevata lipofilia, dimostrata non solo dall'accumulo molto intenso della rodamina B ma particolarmente da quello del blu nilo, colorante basico estremamente lipofilo, il quale alle normali concentrazioni della soluzione colorante esterna viene accumulato dai costituenti lipofili cellulari tanto intensamente da determinare fenomeni necrotici: un fatto di questo genere non è stato ancora riscontrato in altre cellule vegetali.

5. La comparsa di abbondanti sferette di separazione nel citoplasma fondamentale, indotta dall'intrameazione dei coloranti basici e, in *B. atropurpurea* anche dalla caffeina, tipico reattivo cellulare per i tannini, dimostra la presenza in detto citoplasma di un componente di natura polifenolica, in quantità rilevante, presumibilmente non di molto inferiore a quella degli altri costituenti colloidali lipoprotidici. Fenomeni analoghi sono stati riscontrati finora nelle cellule vegetali soltanto in *Bryopsis* e *Derbesia*.

6. Tutte e due le specie di *Bangia* studiate sono molto sensibili ad una reazione acida del mezzo ambiente, tanto che già al di sotto di pH 5 si osservano immediati fenomeni necrotici, caratterizzati da coartazione dei protoplasti.

RIASSUNTO

Ricerche comparate di protoplasmatica sulle cellule di due specie molto affini di *Bangia* (*B. atropurpurea* di acqua dolce e *B. fuscopurpurea* marina) eseguite in vivo con i metodi delle colorazioni vitali impiegando coloranti basici (rosso neutro, blu toluidina, blu nilo) e neutri (rodamina B) e di particolari reazioni citochimiche, hanno permesso di stabilire quanto segue:

a) I fenomeni di permeabilità, intrabilità ed accumulo dei coloranti basici studiati hanno, nelle due specie, gli stessi aspetti qualitativi, mentre le differenze quantitative riscontrate dipendono esclusivamente dall'influenza dell'acqua dolce e dell'acqua marina, nelle quali esse rispettivamente vivono, sul grado di dissociazione e sul coefficiente di ripartizione dei diversi coloranti e quindi sulla capacità di penetrare nelle cellule vive.

b) I coloranti basici vengono fortemente accumulati nel citoplasma delle cellule di *Bangia* con un meccanismo simile a quello finora descritto soltanto in *Bryopsis* e *Derbesia*: dopo una prima fase di accumulo in forma diffusa nel citoplasma fondamentale, per un fenomeno di lipofilia, questi coloranti si combinano con una sostanza citoplasmatica, di presumibile natura polifenolica, determinando la formazione di un rilevante numero di sferette di separazione. Lo stesso fenomeno avviene in seguito alla permeazione di caffeina, tipico reattivo dei tannini.

c) Anche la rodamina B, colorante neutro, viene fortemente accumulata nel citoplasma e nelle altre strutture lipofile cellulari, ma senza provocare fenomeni di smescolamento e in maniera perfettamente reversibile.

d) Le cellule delle due *Bangiae* sono molto sensibili all'acidità del mezzo ambiente e già intorno a pH 5 si incominciano a notare fenomeni di necrosi.

Da questi fatti viene tratta la conclusione che *B. atropurpurea* e *B. fuscopurpurea* abbiano una particolare costituzione citoplasmatica, sensibilmente diversa da quella di tutte le altre piante fino ad oggi studiate sotto questo punto di vista (ad eccezione di *Bryopsis* e *Derbesia*) e caratterizzata da un'elevatissima lipofilia e da un'abbondante presenza di sostanze che presumibilmente appartengono al gruppo dei polifenoli e partecipano alla costituzione dei colloidi plasmatici.

SUMMARY

Comparative «in vivo» studies on the accumulation of basic dyes (neutral red, toluidine blue, Nile blue) and of neutral dye Rhodamine B on two very similar algae (seawater *Bangia fuscopurpurea* and freshwater *B. atropurpurea*) allowed the AA. to state that:

a) permeability, intrability and accumulation of basic dyes in both species have the same qualitative aspects; the different amount of accumulated dye is exclusively in relation with the influence of the seawater and freshwater where the seaweeds live, on the dissociation degree of the dyes, on the repartition coefficient of different dyes and, therefore, on their consequent possibility to penetrate into the living cells;

b) basic dyes are greatly accumulated in the *Bangia* cytoplasm in the same way so far described only in *Bryopsis* and *Derbesia*: a previous diffuse accumulation of the dye in the groundplasm, due to a lipophily phenomenon, is followed by their combination with a presumably polyphenolic cytoplasmatic phase, causing the separation of a large number of small spheres with negative metachromatic effect; a similar phenomenon occurs after caffeine penetration, which is a typical reactive of tannic compounds;

c) neutral dye Rhodamine B is also strongly, reversibly accumulated in the cytoplasm by the lipoid phase, without causing separation phenomena;

d) *Bangia* cells are very sensitive to the environmental pH; cellular necrosis were observed at pH values below 5,0.

From these evidences, the AA. conclude that *B. atropurpurea* and *B. fuscopurpurea* have a particular cytoplasmatic composition, very different from that of all the other plants so far studied from this point of view (except *Bryopsis* and *Derbesia*), consisting in a conspicuous lipophilic phase and probably polyphenolic compounds which are constituents of the cytoplasmatic colloidal complex.

BIBLIOGRAFIA

- BIEBL, R., 1939. *Protoplasmatische Oekologie der Meeresalgen*. Ber. dtsh. bot. Ges., **57**: 1. Generalversammlungs-Heft 78-90.
- BRENNER, S., 1953. *Supravital staining of mitochondria with phenosafranin dyes*. Biochem. et Biophysica Acta, **11**: 480-486.
- DE TONI, B., 1924. *Sylloge algarum*. Vol. **VI**.
- DRAWERT, H., 1938. *Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle*. Planta, **29**: 179-214.
- , 1951. *Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen*. Protoplasma, **40**: 85-106.
- , 1952. *Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat*. Ber. dtsh. bot. Ges., **65**: 263-271.
- , 1953. *Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat*. Ber. dtsh. bot. Ges., **66**: 135-151.
- , 1954. *Vitalfärbung der Plastiden von Allium cepa mit Coelestinblau*. Ber. dtsh. bot. Ges., **67**: 33-42.
- , 1955. *Die vitale Fluorochromierung der Sphärosomen (Mikrosomen) mit einem aliphatisch im N substituirten Aminopyren*. Naturwiss., **42**: 419.
- , 1956. *Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung*. In Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, **11**: 252-289.
- FELDMANN, J., 1959. *Les problèmes de l'étagement des peuplements d'algues marines*. In «Ecologie des algues marines». Coll. Intern. du C.N.R.S., Paris, **81**: 37-41.
- FLASCH, A., 1955. *Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen*. Protoplasma, **44**: 412-421.
- , 1956. *Die Festigkeit der Bindung einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen*. Protoplasma, **45**: 593-614.
- HÖFLER, K., 1947. *Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasma-permeabilität und Stoffspeicherung*. Mikroskopie (Wien), **2**: 13-29.
- , 1948. *Neue Ergebnisse der Vital- und Fluoreszenzfärbung*. Wiss. Mitt. Pharmaz. Forsch.-Inst. Österr. Apothekerver., **1**: 23-27.
- , 1949. *Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie*. Biologia generalis (Wien), **19**: 90-113.

- HÖFLER, K., 1951. *Fluorochromfärbung am lebenden Protoplasten*. Mikrochem., **36/37**: 1146-1157.
- , 1954. *Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung*. Ber. dtsh bot. Ges., **66**: 453-467.
- , 1961. *Vitalfärbestudien an Florideen*. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, **32**: 109-129.
- , 1963. *Zur Vitalfärbbarkeit von Bryopsis*. Protoplasma, **56**: 376-380.
- & L. HÖFLER, 1964. *Zur Vitalfärbbarkeit zentrischer Plankton-Diatomeen*. Protoplasma, **59**: 522-530.
- & H. SCHINDLER, 1955. *Volle und leere Zellsäfte bei Algen*. Protoplasma, **45**: 173-193.
- , W. URL & A. DISKUS, 1956. *Zellphysiologische Versuche und Beobachtungen an Algen der Lagune von Venedig*. Boll. Museo Civ. Storia Naturale Venezia, **11**: 63-94.
- HONSELL, E., 1957. *Colorazione vitale con coloranti basici diacromi e fenomeni di accumulo nel citoplasma di Bryopsis plumosa (Huds.)*. C. Ag. Ann. Fac. Agr. Portici, **23**: 147-157.
- , 1960. *Nuove ricerche sui fenomeni di accumulo di alcuni fluorocromi basici e neutri nel plasma di Bryopsis e Derbesia*. Ann. di Botanica, **26**: 421-434.
- , 1961. *Modificazioni indotte dalla caffeina nello stato colloidale del plasma di Bryopsis e Derbesia e sua azione sui fenomeni di accumulo di alcuni coloranti basici e neutri*. Delpinoa, **3**: 13-28.
- , 1962. *Sulla natura dell'accumulo plasmatico in vivo di alcuni diacromi e fluorocromi basici e neutri in Bryopsis e Derbesia*. Protoplasma, **55**: 632-655.
- , 1963. *Prime osservazioni ultrastrutturali sulle cellule di Bangia fuscopurpurea (Dillw.) Lyngb.* Delpinoa, **5**: 139-155.
- , 1965. *I coloranti vitali e i problemi della loro permeazione ed accumulo nella cellula vegetale*. Giorn. Bot. Ital., **72**: 287-302.
- IRWIN, M., 1926. *Accumulation of dye in Nitella as related to dissociation*. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **23**: 251-253.
- KINZEL, H., 1953. *Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände*. Protoplasma, **42**: 208-226.
- , 1954. *Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften*. Protoplasma, **44**: 52-72.

- KINZEL, H., 1958. *Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe*. Protoplasma, **50**: 1-50.
- & E. BOLAY, 1961. *Über die diagnostische Bedeutung der Entmischung- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen*. Protoplasma, **54**: 179-201.
- PFEFFER, W., 1886. *Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen*. Unters. bot. Inst. Tübingen, **2**: 179.
- PREDA, A., 1909. *Florideae*. Rocca San Casciano.
- STRUGGER, S., 1937. *Die Vitalfärbung als gewebsanalytische Untersuchungsmethode*. Arch. exper. Zellforsch., **19**: 199-208.
- , 1940. *Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot*. Protoplasma, **34**: 601-608.
- , 1949. *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze*. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- TOTH, A., 1952. *Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht*. Protoplasma, **41**: 103-110.
- TRIPODI, G., 1963. *Osservazioni sui fenomeni di accumulo del rosso neutro nel tubo pollinico*. Delpinoa, **5**: 115-128.
- , 1964. *Contributo alla conoscenza citofisiologica della Bangia fuscopurpurea (Dillw.) Lyngb.* Ann. di Botanica, **28**: 41-52.

Tavola I

Fig. 1. — Filamento di *Bangia atropurpurea* colorato con una soluzione di rodamina B (1:10.000) in acqua di fonte a pH 7,8 e osservato al microscopio a fluorescenza. Il colorante si concentra principalmente nel plasma fondamentale, in maniera uniforme, senza provocare la comparsa di sferette di separazione e dando una caratteristica fluorescenza giallo-oro. Nella microfotografia si osserva, inoltre, la fluorescenza rossa dei cromatofori, parzialmente ricoperta da quella della rodamina B., mentre le zone più oscure corrispondono ai vacuoli, i quali non assumono il colorante. (Ingr. 1600 x).

Fig. 2 e 3. — Filamenti di *B. fuscopurpurea* tenuti in una soluzione di rodamina B alla concentrazione di 1:2.000 in acqua di mare (pH 7,8) per 10 minuti e immediatamente osservati al microscopio (fig. 2): l'accumulo del colorante è molto intenso, tanto che la sua fluorescenza è così forte da ricoprire completamente quella rosso-aranciata dei cromatofori. La fig. 3 rappresenta gli stessi filamenti dopo un lavaggio di 5 minuti con acqua marina pura fatta scorrere sotto il vetrino coprioggetto: l'accumulo della rodamina B si è sensibilmente ridotto e persiste soltanto nel citoplasma fondamentale mentre ricompare la fluorescenza primaria dei cromatofori. (Ingr. 160 x).

Fig. 4. — Sferette di separazione nel citoplasma di *B. atropurpurea*, con colorazione metacromatica negativa, la cui comparsa è stata indotta dalla penetrazione del rosso neutro. Le sferette, all'inizio perfettamente omogenee, assumono un aspetto granuloso quando le cellule vengono alcalinizzate con una soluzione molto diluita di ammoniaca. (Ingr. 1400 x).

Fig. 5. — Sferette di separazione nel citoplasma di *B. fuscopurpurea*, sempre con colorazione metacromatica negativa, comparse per colorazione con rosso neutro alla concentrazione 1:10.000 in acqua di mare a pH 5,1. (Ingr. 1400 x).

Fig. 6. — Cellule di *B. atropurpurea* tenute per 10 minuti in una soluzione di rosso neutro (1:10.000) tamponata a pH 2,8. La parete cellulare vera e propria si colora fortemente con metacromasia positiva per la formazione di un legame di adsorbimento fra i cationi del colorante e le cariche negative libere dei costituenti pectici della parete stessa. I protoplasti, invece, non resistono all'acidità della soluzione e presentano fenomeni necrotici caratterizzati da una generale coartazione e da un forte accumulo di colorante, tipico di tutte le cellule morte. (Ingr. 1400 x).

Fig. 7. — Cellule di *B. fuscopurpurea* colorate con blu nilo alla concentrazione 1:50.000 in acqua di mare a pH 7,8. Si osserva una colorazione diffusa del citoplasma con colorazione metacromatica positiva (blu-violetto) e la presenza di sferette di separazione con colorazione metacromatica negativa (blu-verde). (Ingr. 2000 x).

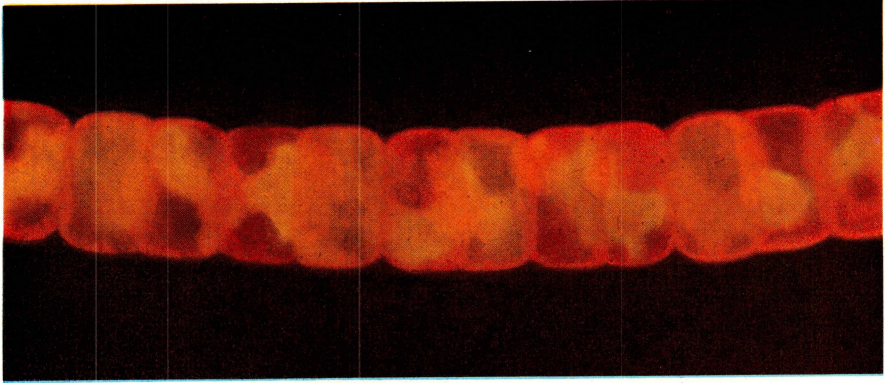
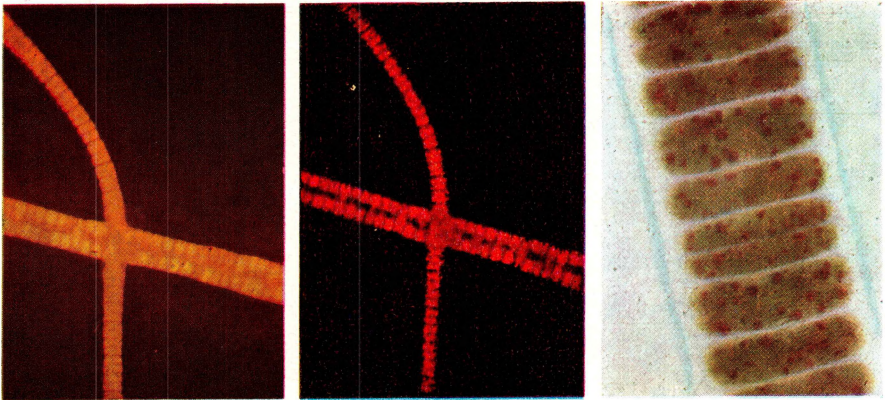
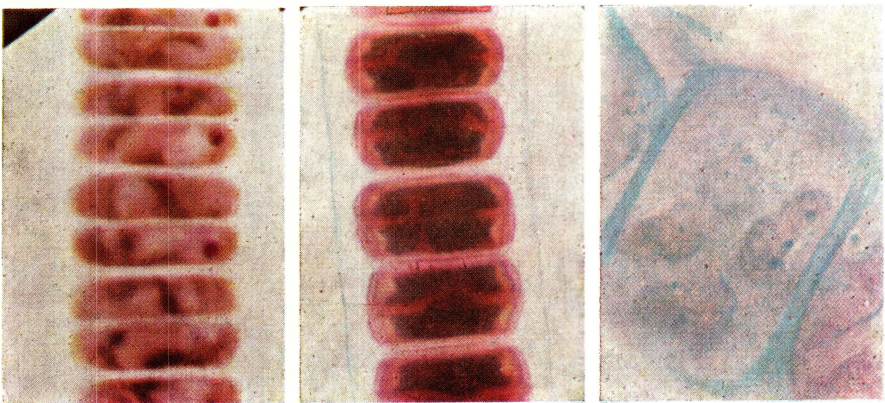


Fig. 1



Figg.
2, 3, 4



Figg.
5, 6, 7