

**Due alghe delle fumarole acide
dei Campi Flegrei (Napoli):
Cyanidium caldarium? (**)**

Molti Autori hanno descritto, in ambienti termali e fortemente acidi, un'alga unicellulare eucariota provvista di ficocianina e di clorofilla; tutti sono stati concordi nell'attribuire tale alga ad una sola *specie*, dapprima indicata con nomi diversi e successivamente, dopo GEITLER (1935), denominata *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler. Essa è caratteristica degli ambienti sede di vulcanismo secondario in diverse parti del mondo, si presenta di forma subsferica e si moltiplica per endospore (TILDEN 1898, GEITLER 1935, HIROSE 1950, FUKUDA 1958, RIGANO 1965 ed Altri).

Ricerche morfologiche, ecologiche e fisiologiche effettuate su ceppi di *C. caldarium* raccolti in diverse località della terra hanno dato spesso risultati non perfettamente concordanti. Alcune delle discordanze tra i diversi AA. riguardano le dimensioni delle cellule.

Anche noi, nel corso di osservazioni morfologiche preliminari su materiale raccolto in punti diversi dei Campi Flegrei, abbiamo notato che le dimensioni delle alghe variano notevolmente a seconda della provenienza. Col presente lavoro ci proponiamo di stabilire se queste differenze di dimensioni sono

(*) 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.

dovute alla variabilità di una sola specie o piuttosto alla presenza di differenti entità sistematiche, con esigenze ecologiche eventualmente diverse.

METODI

Intorno a diverse bocche fumaroliche dei Campi Flegrei, presso Napoli, sono stati prelevati campioni di «*Cyanidium caldarium*» e, per ciascun punto di raccolta, sono stati rilevati la temperatura ed il pH: i valori della temperatura erano compresi nell'intervallo 27 - 56°C e i valori di pH nell'intervallo 0,5 - 1,8.

In laboratorio le alghe sono state coltivate su terreno di ALLEN (1959) sia liquido che solidificato con agar 1,5%. Il pH del terreno liquido era portato a 1,5 mediante aggiunta di H₂SO₄; la superficie del mezzo solido veniva acidificata con un velo di H₂SO₄ 1%. Tutte le colture sono state tenute in ambiente termostato a 40°C. Alle alghe è stata fornita luce continua (8.000 lux) mediante lampade Philips TLD 30 W/55.

Le provette con mezzo solido venivano collocate verticalmente dinnanzi alla sorgente luminosa. Le colture liquide, in beute di vetro, erano poste su un piano oscillante di plexiglas e illuminate dal basso. Non veniva aggiunta CO₂ all'aria dell'ambiente.

Il materiale, prelevato sterilmente in natura, veniva posto in coltura liquida nelle condizioni su esposte e, con successivi trapianti, veniva liberato da spore di funghi e batteri. Mediante successivi passaggi su mezzo solido abbiamo ottenuto colture sicuramente monoalgali. La sterilità delle colture veniva controllata con terreni a base di peptone ed estratto di lievito.

Per le prove di crescita le alghe sono state coltivate a temperature diverse su terreno di ALLEN liquido ed a pH diversi, ottenuti con quantità differenti di H₂SO₄. Le colture sono state condotte in cilindri di vetro in cui veniva fatta gor-

gogliare l'aria ambiente. L'illuminazione a luce continua veniva effettuata lateralmente con lampade Philips TLD 30 W/55 (8.000 lux). La crescita delle alghe è stata misurata con l'ausilio di un colorimetro alla lunghezza d'onda di 550 m μ .

A causa delle variazioni di pH cui è soggetto il terreno di coltura in seguito alla sottrazione, da parte delle alghe, di alcuni ioni (soprattutto NH₄), ogni sei ore abbiamo controllato e, laddove necessario, aggiustato il pH del mezzo mediante aggiunta di alcune gocce di una soluzione acquosa di KOH.

RISULTATI

Abbiamo sottoposto ad esame al microscopio ottico sia i campioni raccolti in natura che le colture di laboratorio. In particolare abbiamo preso in considerazione le dimensioni delle cellule e abbiamo misurato, per ciascun campione, il diametro di 400 cellule, con l'ausilio di un micrometro oculare.

Nei campioni raccolti in natura abbiamo osservato che il diametro cellulare varia notevolmente a seconda del luogo di raccolta. Nelle figg. 1 e 2 sono riportate, come esempio, le misure di alcuni di questi campioni sotto forma di curve e istogrammi di frequenza; abbiamo notato che spesso gli istogrammi si presentano bimodali; il controllo su carta di probabilità dimostra che tutti gli istogrammi, bimodali e non, presentano una evidente asimmetria positiva.

Trovandoci di fronte, dunque, a distribuzioni di frequenza non normali, abbiamo ritenuto opportuno non effettuare analisi statistica sui nostri campioni e ci siamo limitati a riportare qui soltanto curve ed istogrammi di frequenza, dai quali siamo partiti per le successive ricerche.

Comunque, la bimodalità della maggior parte di questi istogrammi ci ha indotti a supporre la presenza, negli ambienti studiati, di popolazioni eterogenee; per tale motivo abbiamo isolato in colture pure un gran numero di ceppi monoalgali.

Gli istogrammi di frequenza relativi al diametro delle cellule di tali colture potevano essere senz'altro riuniti in due gruppi distinti. Più precisamente, su 98 ceppi isolati, 28 erano rappresentati da cellule con diametro variabile tra 2 e 5 μ ; gli altri 70 ceppi erano invece rappresentati da cellule con diametro variabile tra 3 e 11 μ .

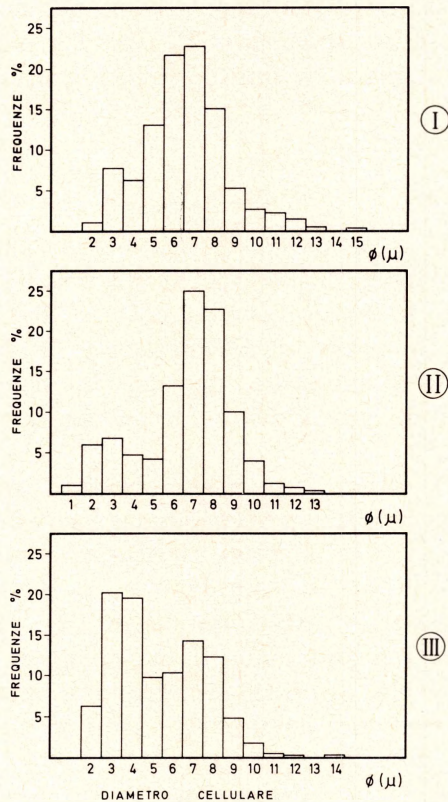


Fig. 1

Fig. 1 - Istogrammi di frequenza relativi al diametro cellulare di popolazioni naturali di «*Cyanidium caldarium*» raccolto in tre stazioni dei Campi Flegrei (Napoli):

- I — stazione 7 (T = 47°C; pH = 1,5);
- II — stazione 25 (T = 33°C; pH = 1,0);
- III — stazione 27 (T = 31°C; pH = 1,0).

Gli istogrammi bimodali dimostrano che le popolazioni sono eterogenee.

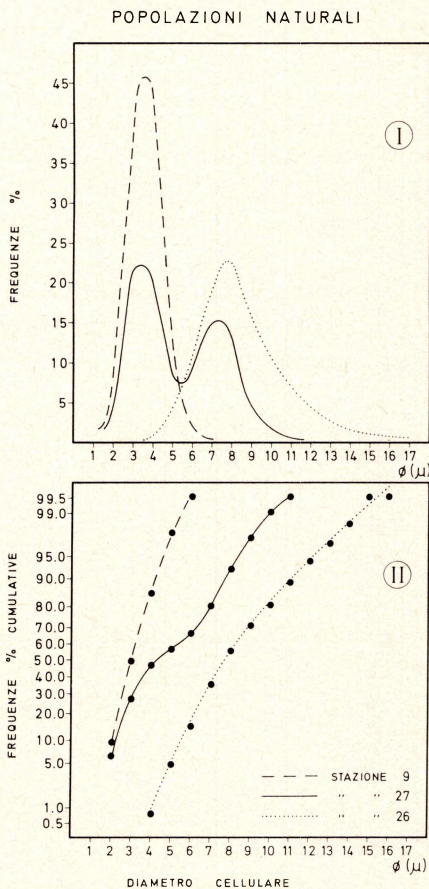


Fig. 2

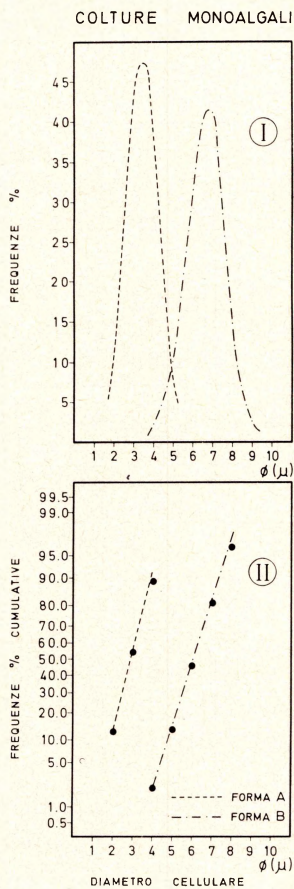


Fig. 3

Fig. 2 - Variabilità del diametro cellulare in «*Cyanidium caldarium*» raccolto in tre stazioni dei Campi Flegrei (Napoli): stazione 9 ($T = 36^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 1,8$); stazione 27 ($T = 31^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 1,0$); stazione 26 ($T = 37^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 0,8$). I - Distribuzioni delle frequenze %; II - Distribuzioni delle frequenze % cumulative su carta di probabilità.

L'andamento delle curve (I), la cui anormalità risulta dal controllo su carta di probabilità (II), dimostra che le popolazioni naturali sono eterogenee.

Fig. 3 - Variabilità del diametro cellulare in due colture monoalgali di «*Cyanidium caldarium*», chiamate provvisoriamente, nel presente lavoro, *forma A* (cellule più piccole) e *forma B* (cellule più grandi) ($T = 40^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 1,5$). I - Distribuzioni delle frequenze %; II - Distribuzioni delle frequenze % cumulative su carta di probabilità.

L'andamento delle curve (I) e il controllo su carta di probabilità (II) dimostrano che con colture monoalgali si ottengono due distinte popolazioni, ciascuna delle quali è omogenea.

Il confronto tra la Fig. 2 e la Fig. 3 mette chiaramente in evidenza che in natura vi sono popolazioni miste di due distinte alghe, che è possibile isolare in colture pure.

Nella fig. 3 sono riportate le curve relative alla distribuzione delle frequenze di due ceppi isolati in coltura pura, l'uno costituito da un'alga più piccola, l'altro da un'alga più grande.

I valori medi del diametro cellulare di tali due ceppi, nelle nostre condizioni di coltura indicate sopra (terreno liquido; T = 40°C; pH = 1,5), sono rispettivamente:

forma piccola (A)	$3,42 \pm 0,11 \mu$
forma grande (B)	$6,61 \pm 0,14 \mu$

Ci è lecito affermare che *si tratta di due alghe diverse*, poichè la differenza tra le due medie è significativa ad un livello di probabilità superiore a 99% ($t = 48,3$ per 400 esemplari misurati in ciascun campione).

Provvisoriamente indichiamo come *forma A* l'alga di tipo piccolo e come *forma B* quella del tipo grande.

Tutte le nostre colture monoalgali della *forma A* sono costituite da piccole cellule subsferiche (2 - 5 μ), di colore verdeazzurro, moltiplicantisi sempre mediante formazione di 4 endospore, disposte a tetraedro: in questo stadio le dimensioni dell'alga sono di 4 - 5 μ . Le endospore sono grandi circa 2 μ .

Tutte le nostre colture monoalgali della *forma B* sono invece costituite da cellule sferiche (3 - 11 μ), di colore verde intenso, moltiplicantisi per mezzo di numerose endospore (4 - 8 - 16); in questo stadio le dimensioni della cellula, divenuta sporangio, sono di 6 - 11 μ circa (eccezionalmente 16 μ). In materiale prelevato in natura, riferibile alla nostra *forma B*, abbiamo talvolta osservato cellule con 32 endospore e con un diametro di 28 μ . Il materiale della *forma B* da noi studiato ha un numero di endospore che può quindi variare da 4 a 32, influenzando così le dimensioni della cellula, trasformata in sporangio, che le contiene; inoltre il numero delle endospore e le dimensioni delle cellule dipendono anche dalle condizioni

ambientali. Le dimensioni medie delle endospore della forma B sono di 3 - 4 μ .

Da un esame al microscopio elettronico effettuato da CASTALDO (comunicazione personale) è risultato che le cellule della nostra *forma B* sono identiche a quelle da lei descritte come *Cyanidium caldarium* e che le cellule della *forma A* sono identiche a quelle da lei descritte come *forma indeterminata* (CASTALDO 1968).

Abbiamo anche effettuato l'estrazione di clorofille e ficobiline da colture pure di entrambe le alghe, rispettivamente con i metodi di ZSCHEILE & COMAR e di TISELIUS riportati da LEDERER (1960). Abbiamo così riscontrato che entrambe le forme posseggono clorofilla *a* e C-ficocianina, cioè quegli stessi pigmenti già riportati per *Cyanidium caldarium* in letteratura (ALLEN 1959, HIROSE 1950 e 1958, NICHOLS & BOGORAD 1960, RIGANO 1965).

Infine abbiamo voluto individuare gli optima di pH e di temperatura, in coltura, dei ceppi da noi isolati. Abbiamo scelto valori di pH e di temperatura prossimi a quelli rilevati in natura: più precisamente abbiamo seguito la crescita di colture mantenute alle temperature di 30 - 35 - 40 - 45 - 50 °C (pH = 1,5), nonchè di colture mantenute a pH 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 (T = 40°C).

Per ogni coltura abbiamo ricavato, con il metodo della retta di regressione, la costante di crescita *k*, che viene qui intesa come:

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

Le figg. 4 e 5 rappresentano le variazioni della costante di crescita *k* per la *forma A* e per la *forma B* al mutare della temperatura e del pH. Dai grafici risulta evidente che entrambi i

ceppi sono acidofili e termofili, ma che la *forma B*, nelle nostre condizioni di coltura, risulta più acidofila e più termofila rispetto alla *forma A*.

Questi studi saranno da noi approfonditi, per ambedue le forme, specialmente nella ricerca dei limiti inferiori e superiori di pH e di temperatura, anche in condizioni di coltura diverse da quelle descritte nel presente lavoro.

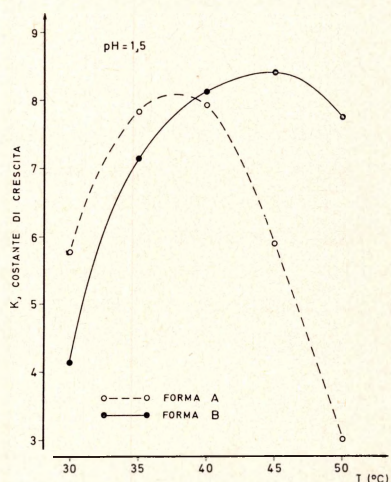


Fig. 4

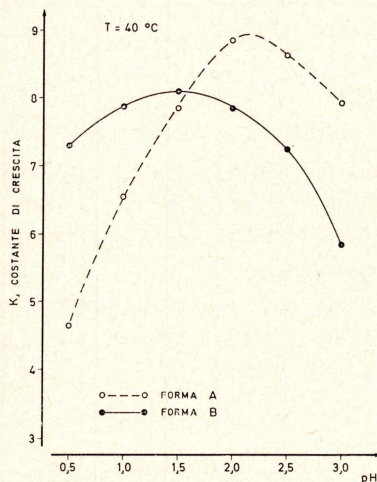


Fig. 5

Fig. 4 - Confronto tra le velocità di crescita (k), a temperature diverse, in *Cyanidium caldarium forma A* e *forma B*, in colture pure monoalgali (pH = 1,5).

Fig. 5 - Confronto tra le velocità di crescita (k), a pH diversi, in *Cyanidium caldarium forma A* e *forma B*, in colture pure monoalgali (T = 40°C).

La *forma B* risulta più termofila e più acidofila della *forma A*.

CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro ci hanno permesso di identificare, nella flora degli ambienti termali acidi dei Campi Flegrei, due differenti alghe unicellulari eucariote. Queste due alghe, da noi isolate in colture monoalgali pure, possono essere di-

stinte in base alle dimensioni: le cellule di una hanno diametro di 2 - 5 μ , quelle dell'altra hanno diametro di 3 - 16 μ . Provvisoriamente abbiamo chiamato *forma A* l'alga più piccola e *forma B* l'alga più grande.

Ambedue le alghe si moltiplicano esclusivamente per endospore, ma mentre nella *forma A* queste sono sempre 4, nella *forma B* il loro numero può variare (4 - 8 - 16 - 32).

Entrambe le alghe possiedono clorofilla *a* e C-ficocianina.

Le due alghe sono termofile e acidofile: nelle nostre condizioni di coltura e con i ceppi da noi isolati, gli optima di temperatura sono all'incirca di 38°C per la *forma A* e di 45°C per la *forma B*. Per quanto riguarda il pH la *forma A* presenta il suo optimum a 2,2 e la *forma B* ad 1,5 ca.

Nonostante le somiglianze esistenti tra le due *forme*, da questi risultati appare evidente che le due alghe appartengono ad *entità sistematiche differenti*, in quanto ognuna di esse presenta caratteristiche morfologiche e fisiologiche proprie. Senonchè tutti gli AA. hanno indicato, fino ad oggi, come unico organismo autotrofo presente negli ambienti termali e fortemente acidi, la sola specie *Cyanidium caldarium*; inoltre, sulla base delle descrizioni di tali AA., ambedue le nostre forme potrebbero essere identificate con questa specie. Probabilmente anche negli altri ambienti termali acidi sono presenti più *forme*, forse riferibili, almeno in parte, alla nostra *forma A* ed alla *forma B*. È verosimile, quindi, che sotto il nome *Cyanidium caldarium* altri AA. abbiano studiato alghe unicellulari appartenenti ad entità sistematiche diverse.

RIASSUNTO

Gli Autori hanno studiato in natura ed in coltura alghe degli ambienti termali ed acidi dei Campi Flegrei (Napoli), riferite sino ad oggi a *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler. Essi hanno identificato in tali ambienti due differenti alghe unicellulari eucariote, che vivono mescolate in percentuali variabili.

Pur ritenendo che si tratta di due alghe ben diverse sistematicamente, forse anche attribuibili a due differenti generi, gli Autori, dopo aver isolato in colture pure monoalgali queste due alghe, provvisoriamente ed in attesa di ulteriori studi, le chiamano rispettivamente *Cyanidium caldarium forma A* e *C. caldarium forma B* e ne descrivono le differenze caratteristiche.

SUMMARY

The Authors studied — both in their natural environment and in culture — some algae of the thermal and acid soils of Campi Flegrei (Naples), which had been ascribed until now to *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler. In those environments they identified two different unicellular eucaryotic algae.

On the basis of the morphological and physiological characteristics reported for *C. caldarium* by other Authors, both the algae of Campi Flegrei studied in this paper can be identified with this same species, *Cyanidium caldarium*.

Although the Authors think that the two algae belong to different taxa, may be, to two different genera, they give to these two algae the provisional names of *Cyanidium caldarium forma A* and *C. caldarium forma B* respectively, until further studies are carried out.

Both algae reproduce by endospores exclusively, but while these are always 4 in the *forma A*, their number may vary (4-8-16-32) in the *forma B*.

Both algae are provided with chlorophyll *a* and C-phycoyanin.

The two algae are thermophilic and acidophilic: under culture conditions the optimum temperatures for the strains isolated by the Authors are about 38°C for the *forma A* and 45°C for the *forma B*. Moreover the *forma A* shows its optimum at pH = 2.2 while the *forma B* at pH = 1.5.

There is the possibility that various *formae* are present also in other acid thermal environments and that they may be ascribed, partially at least, to the *forma A* and *forma B*.

It is likely therefore that under the name *Cyanidium caldarium* some Authors have studied unicellular algae belonging to different systematic groups.

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, ecc.* Delpinoa, **8-9**: 135-147.
- FUKUDA, I., 1958. *Physiological studies on thermophilic bluegreen alga Cyanidium caldarium Geitler*. Bot. Mag., **71**: 79-86.
- GEITLER, L. & F. RUTTNER, 1935. *Die Cyanophyceen der deutschen limnologischen Sunda Expedition, ecc.* Arch. Hydrobiol., suppl., **14**: 371-481.
- HIROSE, H., 1950. *Studies on a thermal alga, Cyanidium caldarium*. Bot. Mag., **63**: 107-111.
- —, 1958. *Rearrangement of the systematic position of a thermal alga, Cyanidium caldarium*. Bot. Mag., **71**: 347-352.
- LEDERER, E., 1960. *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Ed. Masson, Paris, **2**: 428-432 et 632-633.
- NICHOLS, K. E. & L. BOGORAD, 1960. *Studies on phycobilin formation with mutants of Cyanidium caldarium*. Nature, **188**: 870-872.
- RIGANO, C., 1965. *Presenza dell'alga unicellulare Cyanidium caldarium nei terreni fumarolici dei Campi Flegrei e di Ischia*. Delpinoa, **6-7**: 277-284.
- TILDEN, J. E., 1898. *Observations on some west american thermal algae*. Bot. Gaz., **25**: 89-105 (sub: Protococcus botryoides f. caldarius).