

Paolo De Luca\*

Aldo Musacchio\*

Roberto Taddei\*

**Osservazioni sui pigmenti  
delle due forme di *Cyanidium caldarium*  
dei Campi Flegrei (Napoli). \*\***

Vari Autori hanno esaminato i pigmenti dell'alga termale acidofila *Cyanidium caldarium*; tutti sono stati concordi nell'affermare che essa possiede clorofilla *a* e *C-ficocianina*. ALLEN e Altri (1960) esaminarono i carotenoidi dell'alga proveniente dallo Yellowstone Park e vi riscontrarono la presenza di  $\beta$ -carotene, zeaxantina e luteina.

In precedenti lavori (CASTALDO 1968; DE LUCA, TADDEI 1970) fu messa in evidenza, in materiale proveniente dai Campi Flegrei, la presenza di due alghe eucariote, acidofile e termali, fornite di clorofilla *a* e di *C-ficocianina*; entrambe le alghe risultarono attribuibili alla specie *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler, secondo le descrizioni degli Autori; tuttavia esse erano ben distinguibili tra loro sulla base di caratteristiche morfologiche e fisiologiche. Ad esse furono assegnati i nomi provvisori *Cyanidium caldarium forma A* e *C. caldarium forma B* (DE LUCA, TADDEI 1970), nomi che usiamo anche nel presente lavoro.

Successivamente furono eseguite nuove ricerche ultrastrutturali (CASTALDO 1970) e fisiologiche (DE LUCA, TADDEI 1972; DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI 1972).

---

\* 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.

Scopo del presente lavoro è quello di esaminare il contenuto in pigmenti di *C. caldarium forma A* e di *C. caldarium forma B*, al fine di porre in evidenza eventuali altre differenze esistenti tra le due alghe e di eseguire confronti con i dati forniti dalla letteratura e relativi a *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler.

#### MATERIALE E METODI

Abbiamo utilizzato gli stessi ceppi monoalgali di *C. caldarium forma A* e di *C. caldarium forma B* da noi impiegati nei precedenti lavori.

Le alghe sono state allevate su mezzo di ALLEN (1959), portato a pH = 1,5, alla temperatura di 40° C, in beute di vetro da 1 litro, poste su piano oscillante di plexiglas e illuminate dal basso con lampade Philips TLD 30 W/55 (8.000 lux).

Una analisi dei pigmenti in vivo è stata fatta su sospensioni di cellule esaminate allo spettrofotometro secondo il metodo dell'*opal glass* di SHIBATA e AL. (1954).

I carotenoidi sono stati estratti secondo i metodi consigliati da KARRER, JUCKER (1950) e la loro identificazione è stata eseguita anche per confronto con campioni standard, mediante cromatografia TLC su lastre « DC-Fertigplatten Kieselgel F<sub>254</sub> » della Merck, sviluppata con benzene: etanolo (95 : 5) (vedi Fig. 1). Sulla base dei dati di ALLEN e Altri (1960), come campioni standard abbiamo usato rispettivamente:  
β-carotene sintetico della Merck  
luteina estratta da *Calendula officinalis*  
zeaxantina estratta da *Zea mays* (cfr. KARRER, JUCKER 1950).

Una estrazione dei carotenoidi è stata eseguita anche da cellule della *forma B* coltivate al buio su glucosio. Analogamente

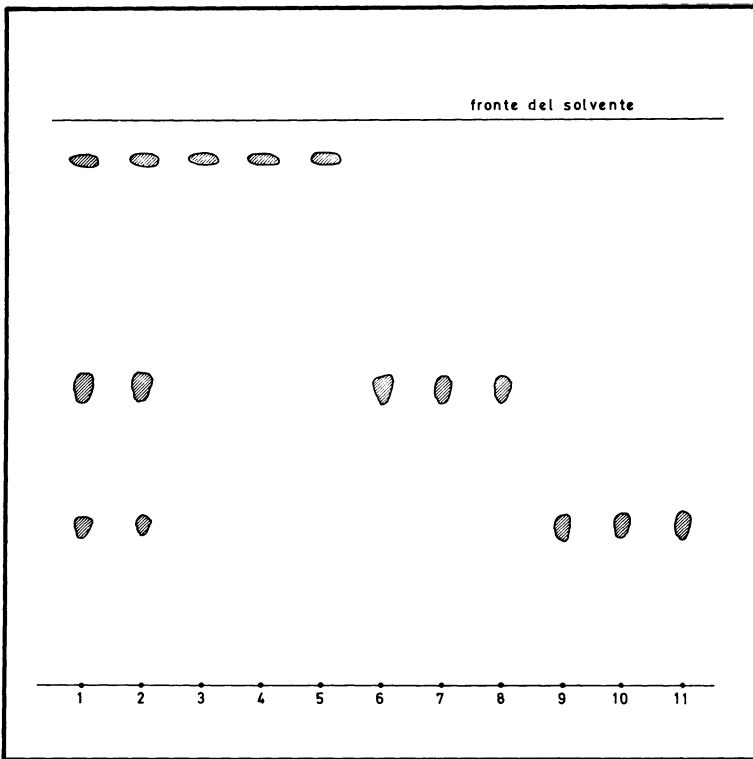


Fig. 1 — Carotenoidi in cromatografia TLC (vedi testo):

- 1 — estratto completo di *Cyanidium caldarium* forma A
- 2 — estratto completo di *C. caldarium* forma B
- 3 —  $\beta$ -carotene sintetico
- 4 — 1° pigmento della forma A
- 5 — 1° pigmento della forma B
- 6 — luteina di *Calendula officinalis*
- 7 — 2° pigmento della forma A
- 8 — 2° pigmento della forma B
- 9 — zeaxantina di *Zea mays*
- 10 — 3° pigmento della forma A
- 11 — 3° pigmento della forma B

esperimento non è stato eseguito sulla *forma A*, perché essa è autotrofa obbligata (DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI 1972).

Per l'analisi quantitativa dei carotenoidi è stata effettuata una cromatografia su colonna di  $ZnCO_3$ , sviluppata con i seguenti eluenti, nell'ordine:

- 1) benzene . . . . . inizio cromatografia
- 2) et. petr. 30-50° : et. etil. (95 : 5) . . . . . 1° pigmento
- 3) et. petr. 30-50° : et. etil (80 : 20) . . . . . 2° pigmento
- 4) et. petr. 30-50° : metanolo (94 : 6) . . . . . 3° pigmento

Su tutti i pigmenti sono stati eseguiti esami spettrofotometrici qualitativi e quantitativi. Per il dosaggio quantitativo, ci siamo attenuti ai coefficienti di estinzione specifica riportati in letteratura (GOODWIN 1955).

## RISULTATI

Le due alghe dei Campi Flegrei, *C. caldarium forma A* e *C. caldarium forma B*, possiedono lo stesso corredo di pigmenti: C-ficocianina, clorofilla *a*,  $\beta$ -carotene (1° pigmento) e due xantofille (2° e 3° pigmento), che ci sembrano essere luteina e zeaxantina rispettivamente, sia in base alle nostre indagini, sia per analogia con i dati di ALLEN e Al. (1960).

Dalla Fig. 2 si rileva che la *forma A* possiede, a parità di volume cellulare, una quantità di pigmenti più che doppia di quella della *forma B*. Inoltre appare che il rapporto ficocianina/clorofilla è decisamente maggiore nella *forma A* rispetto alla *forma B*, allevate nelle identiche condizioni di coltura, riportate precedentemente.

Dalla Tab. 1, relativa ai carotenoidi, si rileva che la *forma A* e la *forma B* possiedono gli stessi pigmenti, raffrontabili con quelli del *C. caldarium* dello Yellowstone Park, stu-

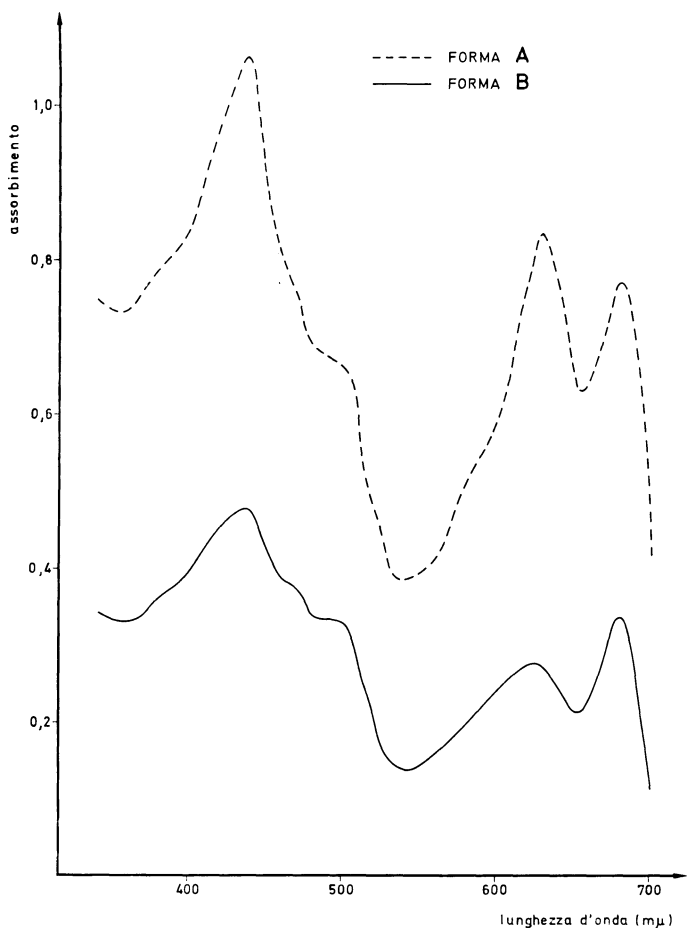


Fig. 2 — Spettri di assorbimento *in vivo* di un egual volume di cellule di *C. caldarium* forma A e di *C. caldarium* forma B, coltivati nelle medesime condizioni.

Si noti che il rapporto clorofilla/ficocianina ( $E_{680}/E_{630}$  circa) risulta invertito nelle due alghe.

Si noti inoltre che, a parità di volume cellulare, la *forma A* possiede una quantità di pigmenti all'incirca doppia di quella della *forma B*.

diato da ALLEN e Al. (1960). Inoltre nella *forma A* prevale la zeaxantina (48% del totale), mentre nella *forma B* il  $\beta$ -carotene è il più abbondante (55%) dei tre carotenoidi.

	Allen e Al. 1960	C. c. forma A	C. c. forma B	forma B al buio
$\beta$ -carotene	54,4	30	55	17
luteina	13,8	22	13	23
zeaxantina	31,8	48	32	60

Tabella 1 — Contenuto in carotenoidi del *Cyanidium caldarium* dello Yellowstone Park (1<sup>a</sup> colonna) messo a confronto con quello della *forma A* e della *forma B* dei Campi Flegrei (2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> colonna). Nella 4<sup>a</sup> colonna i valori relativi alla *forma B* coltivata al buio su glucosio.

Si noti la stretta affinità esistente tra l'alga dello Yellowstone Park e la nostra *forma B*.

Nella Tab. 1 figura anche l'analisi dei carotenoidi della *forma B* coltivata per 40 giorni al buio su glucosio. Va ricordato che la C-ficocianina e la clorofilla *a* non vengono sintetizzate in tale condizione. I carotenoidi, invece, sono ancora tutti e tre presenti; tuttavia la quantità di  $\beta$ -carotene risulta fortemente diminuita, relativamente agli altri due carotenoidi.

## CONCLUSIONI

Le due alghe dei Campi Flegrei, provvisoriamente chiamate *C. caldarium forma A* e *C. caldarium forma B* (DE LUCA, TADDEI 1970), possiedono qualitativamente lo stesso corredo di pigmenti: C-ficocianina, clorofilla *a*,  $\beta$ -carotene, luteina e zeaxantina (Fig. 1).

Da un punto di vista quantitativo, nelle nostre condizioni di coltura, esistono differenze tra le due alghe sia riguardo al rapporto C-ficocianina/clorofilla *a* (Fig. 2), sia riguardo ai carotenoidi (Tab. 1), per i quali ci è possibile fare un confronto anche con i dati di ALLEN e AL. (1960).

Dalla Tab. 1 risulta evidente non solo una notevole differenza tra la *forma A* e la *forma B*, ma anche una corrispondenza molto stretta tra la nostra *forma B* ed il *C. caldarium* di ALLEN, proveniente dallo Yellowstone Park (U.S.A.); tutto questo conferma l'affinità esistente tra la nostra *forma B* e il *C. caldarium* di ALLEN, come già fu osservato da DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI (1972) a proposito della crescita in eterotrofia\*.

Nella *forma B*, posta in condizioni eterotrofiche, accanto alla scomparsa della ficocianina e della clorofilla, risulta alterato anche il rapporto quantitativo tra i vari carotenoidi.

La presenza della clorofilla *a* e della sola C-ficocianina, tipica delle Cyanophyceae, è riportata, fra le alghe eucariote, solo per *Porphyridium aeruginum*, attualmente incluso fra le Rhodophyceae più primitive, oltre che per *Cyanidium caldarium*.

Per quanto riguarda i carotenoidi identificati, non ci è possibile effettuare alcuna definitiva deduzione di carattere sistematico. Il  $\beta$ -carotene, infatti, è universalmente presente nel mondo vegetale. Zeaxantina e luteina sono riportate entrambe per

---

\* *C. caldarium forma A* è autotrofo obbligato, mentre *C. caldarium forma B* è eterotrofo facoltativo (DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI 1972). *C. caldarium* dello Yellowstone Park è eterotrofo facoltativo (ALLEN 1959).

un gran numero di classi (GOODWIN 1965, p. 131), fra cui Rhodophyceae e Cyanophyceae.

La presenza della sola clorofilla *a*, e della C-ficocianina in cellule eucariote, nonché la mancanza di echinenone, farebbero propendere per una inclusione delle alghe in questione fra le Rhodophyceae, piuttosto che fra le Cyanophyceae.

#### SUMMARY

The AA. have studied the pigments of the two algae isolated at the Campi Flegrei (Naples) and temporarily called *Cyanidium caldarium forma A* and *C. caldarium forma B*.

Both algae show the same kinds of pigments: chlorophyll *a*, C-phycoyanin,  $\beta$ -carotene, lutein and zeaxanthin.

As far as the quantity of pigments is concerned, there are remarkable differences between the two algae.

First of all, volume being equal, the ratio chlorophyll/phycoyanin is definitely higher in the *forma A* than in the other one; moreover the percent carotenoid composition of the two algae is remarkably different and is respectively, for the *forma A*: 30%  $\beta$ -carotene, 48% zeaxanthin, 22% lutein; and for the *forma B*: 55%  $\beta$ -carotene, 32% zeaxanthin, 13% lutein.

Finally, when the *forma B* (facultative heterotroph) is grown on glucose in the dark, does not synthesize neither phycoyanin nor chlorophyll and shows a decrease of the  $\beta$ -carotene fraction, which gets as low as 17% of the total amount of carotenoids.

The percent carotenoid composition and the lacking synthesis of chlorophyll and phycoyanin under heterotrophic conditions evidentiate a close relationship between the *forma B* of the Campi Flegrei and the *C. caldarium* of Yellowstone Park studied by ALLEN et Al..



BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. B., 1959. *Studies with Cyanidium caldarium an anomalously pigmented chlorophyte*. Ark. Microbiol., **32**: 270-277.
- — , T. W. GOODWIN, S. PHAGPOLNGARM, 1960. *Carotenoid distribution in certain naturally occurring algae and in some artificially induced mutants of Chlorella pyrenoidosa*. J. gen. Microbiol., **23**: 93-103.
- CASTALDO R., 1968. *Ricerche sull'ultrastruttura del Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, **8-9**: 135-147.
- — , 1970. *Ultrastruttura di due forme isolate dalle popolazioni di Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler*. Delpinoa, **10-11**: 91-109.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium ?*. Delpinoa, **10-11**: 79-89.
- — , R. TADDEI, 1972. *Crescita comparata di due forme di «Cyanidium caldarium» dei Campi Flegrei (Napoli) in presenza di diverse fonti di azoto*. Delpinoa, **12-13**: 3-8.
- — , A. MUSACCHIO, R. TADDEI, 1972. *Diverso comportamento in eterotrofia delle due forme di «Cyanidium caldarium» dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, **12-13**: 19-27.
- GOODWIN T. W., 1955. *Carotenoids*; in: *Modern methods of plant analysis*, **3**: 272-311. Springer Verlag, Berlin.
- — , 1965. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press, London & New York.
- ISLER O., 1971. *Carotenoids*. Birkhäuser Verlag, Basel & Stuttgart.
- KARRER P., E. JUCKER, 1950. *Carotenoids*. Elsevier Publishing Company, New York.
- SHIBATA K., A. A. BENSON, M. CALVIN, 1954. *The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms*. Bioch. Biophys. Acta, **15**: 461-470.