

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 β -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 F₂₅₄ » 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

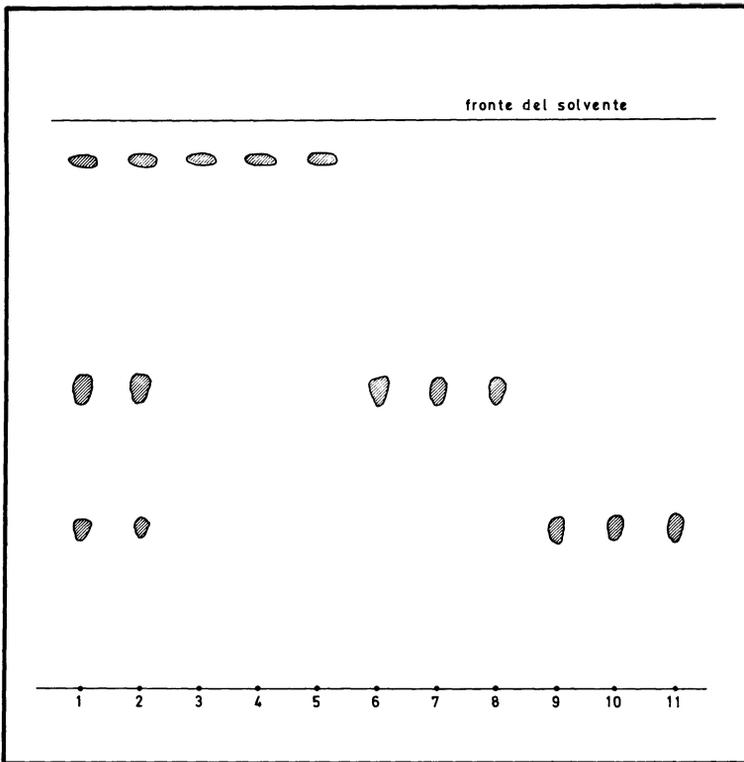


Fig. 1 — Carotenoidi in cromatografia TLC (vedi testo):

- 1 — estratto completo di *Cyanidium caldarium* forma A
- 2 — estratto completo di *C. caldarium* forma B
- 3 — β -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*, β -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-

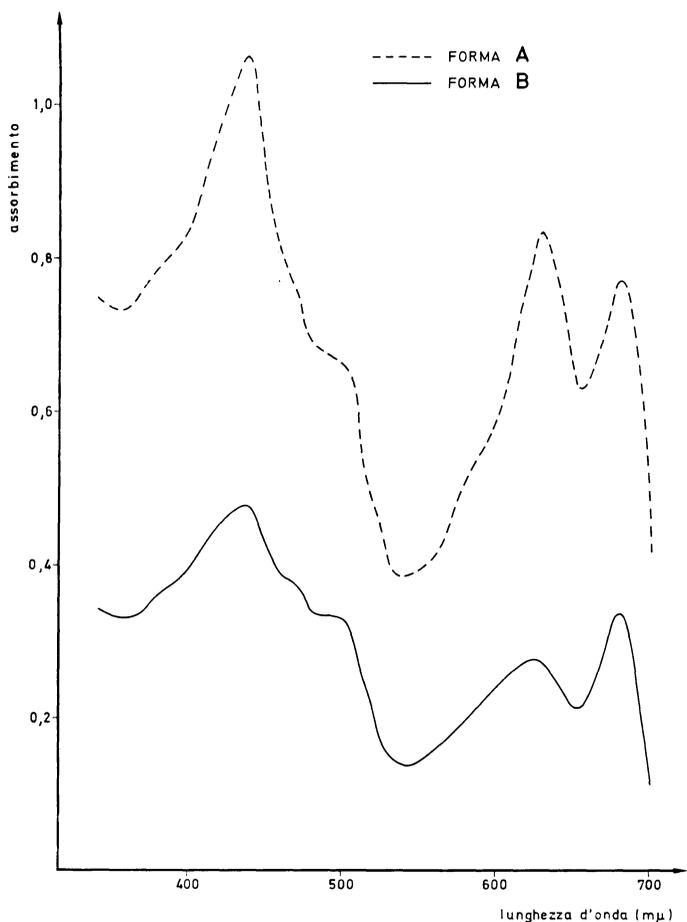


Fig. 2 — Spettri di assorbimento *in vivo* di un egual volume di cellule di *C. caldarium* forma A e di *C. caldarium* forma B, coltivati nelle medesime condizioni.

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 β -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 |
|-------------------|---------------------|------------------|------------------|--------------------|
| β -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^a colonna) messo a confronto con quello della *forma A* e della *forma B* dei Campi Flegrei (2^a e 3^a colonna). Nella 4^a 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 β -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*, β -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 β -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, β -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% β -carotene, 48% zeaxanthin, 22% lutein; and for the *forma B*: 55% β -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 β -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.