

Paolo De Luca(*)

Aldo Moretti(*)

Roberto Taddei (*)

Influenza del pH sulle dimensioni cellulari

di *Cyanidium caldarium forma B.* (**)

In precedenti lavori (DE LUCA, TADDEI 1970; DE LUCA, MORETTI, MUSACCHIO, TADDEI 1974; DE LUCA, MORETTI, TADDEI 1974; PINTO, TADDEI 1975) fu segnalata la presenza di *Cyanidium caldarium forma B* (spesso accompagnato da *C. caldarium forma A*) in numerose località italiane.

Sulla base di osservazioni preliminari al microscopio ottico, abbiamo constatato che l'alga in questione presenta differenze morfologiche (evidenti soprattutto per quanto concerne il diametro cellulare) a seconda della provenienza dei singoli ceppi ed anche al variare delle condizioni ambientali.

Scopo del presente lavoro è quello di studiare le variazioni del diametro cellulare, al variare del pH del mezzo di coltura, in diciotto ceppi di *C. caldarium forma B* provenienti da altrettante località italiane.

(*) Istituto di Botanica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

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

MATERIALI E METODI

Abbiamo utilizzato diciotto ceppi di *C. caldarium forma B*, provenienti dalle seguenti località italiane:

Sciacca (AG)	Acquasanta Terme (AP)
Castellammare d. G. (TP)	Bagni di Tivoli (Roma)
Sclafani Bagni (PA)	Bagni di Stigliano (Roma)
Terme Luigiane (CS)	Civitavecchia (Roma)
Cerchiara di Cal. (CS)	Orbetello (GR)
Bagni Contursi (SA)	Saturnia (GR)
Telese (BN)	Bagni San Filippo (SI)
Isola d'Ischia (NA)	Rapolano Terme (SI)
Campi Flegrei (NA)	Sasso Pisano (PI)

I diciotto ceppi, isolati in colture monoalgali, sono stati inizialmente coltivati sterilmente nelle seguenti condizioni: 35 ml di terreno di ALLEN liquido, contenuto in beute da 100 ml, poste su un piano oscillante di plexiglas, illuminate dal basso a luce continua con lampade Philips TLD 30 W/55 (8.000 lux), in ambiente termostato a 40°C.

Per ciascun ceppo sono state impiegate sei di tali beute a sei pH diversi (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5).

Dopo un periodo di adattamento di 7 giorni, le 108 (= 18 x 6) colture sono state novamente insemminate in altrettante beute contenenti lo stesso terreno di coltura (sei diversi pH per ciascun ceppo) e tali beute sono state poste nelle

identiche condizioni sopra esposte (*). Questa volta l'inseminamento è stato effettuato in modo che la quantità di alghe fosse approssimativamente la stessa nelle varie beute.

La crescita delle alghe è stata seguita mediante lettura al colorimetro alla lunghezza d'onda di 550 m μ .

Al terzo giorno di coltura in queste condizioni (cioè in piena fase esponenziale)(*) le alghe sono state osservate al microscopio ottico e per ciascuna coltura è stato misurato il diametro di 400 cellule con l'ausilio di un micrometro oculare.

RISULTATI

Le velocità di crescita k (**) dei diciotto ceppi di *C. caldarium forma B*, coltivati a sei diversi pH, sono riportate nella Tab. 1.

Nella Fig. 1, a titolo di esempio, sono riportati i grafici che rappresentano le variazioni della velocità di crescita k al variare del pH, relativi a tre di questi ceppi (Sciacca, Campi Flegrei, Rapolano Terme).

(*) Fra i risultati esposti nel presente lavoro, quelli relativi alle alghe dei Campi Flegrei e di Acquasanta, coltivati a pH = 1,5, sono apparentemente in disaccordo con quelli in precedenza pubblicati (DE LUCA, TADDEI 1970; DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI 1974). In realtà, rispetto a questi due precedenti lavori, sono qui variati almeno due fattori; riportiamo quindi, a titolo di confronto, le condizioni rispettate nei due precedenti lavori:

- 1) colture in cilindri di vetro e aerazione ottenuta per gorgogliamento;
- 2) prelievo delle alghe eseguito alla fine della fase esponenziale.

(**)

$$k = \frac{\Delta \log \text{densità ottica}}{\Delta \text{tempo (in giorni)}} \cdot 10^2$$

localita' di provenienza	pH					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Sciacca	9	13	20	20	19	17
Castellammare d. Golfo	3	10	16	22	12	10
Sclafani Bagni	5	8	8	7	5	4
Terme Luigiane	9	14	18	19	18	18
Cerchiara di Calabria	7	10	11	10	10	8
Bagni Contursi	12	15	18	17	13	12
Telese	11	15	18	19	18	16
Isola d' Ischia	7	13	18	21	19	13
Campi Flegrei	12	16	21	23	21	20
Acquasanta Terme	11	17	20	22	21	19
Bagni di Tivoli	6	10	12	13	10	9
Bagni di Stigliano	10	15	20	26	24	17
Civitavecchia	5	6	7	7	5	4
Orbetello	8	12	21	26	18	14
Saturnia	7	14	19	24	23	22
Bagni San Filippo	14	15	19	21	19	14
Rapolano Terme	11	16	21	23	17	15
Sasso Pisano	9	17	20	24	16	12
velocita' di crescita (k)						

Tabella 1

La Tab. 1 e la Fig. 1 dimostrano che per tutti i ceppi studiati l'optimum di crescita giace in prossimità di $\text{pH} = 1,5$.

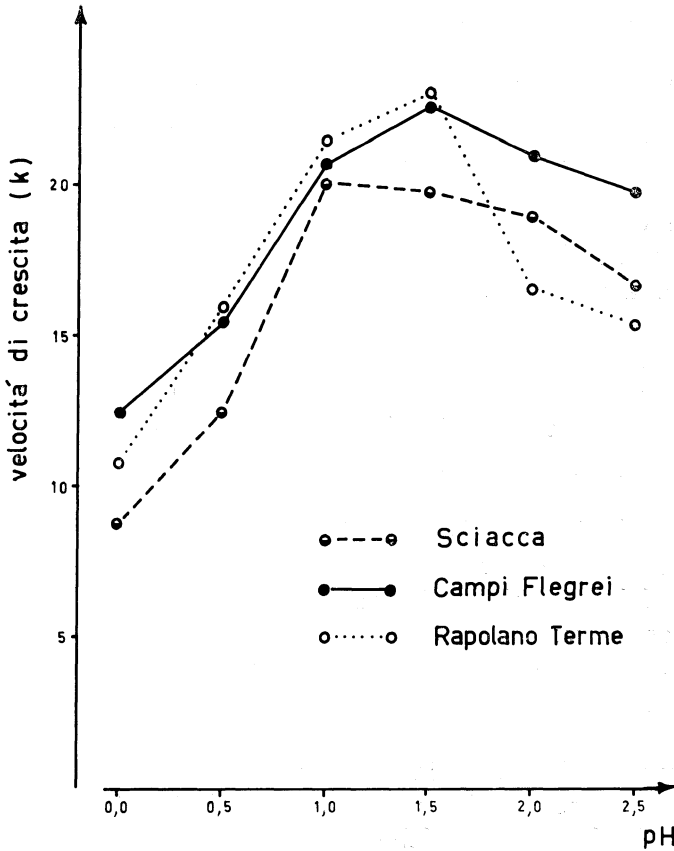


Fig. 1. Velocità di crescita k in funzione del pH in tre ceppi di *Cyanidium caldarium* forma *B*, provenienti da 3 diverse località: Sciacca, Campi Flegrei, Rapolano Terme.

Per altri ceppi dell'alga, studiati nel presente lavoro, vedi Tabella 1.

Si noti che l'optimum di crescita giace sempre in prossimità di $\text{pH} = 1,5$.

Per quanto riguarda il diametro cellulare, sempre a titolo di esempio, abbiamo riportato in Fig. 2 solamente 3 istogrammi di frequenza, relativi al diametro cellulare del ceppo dei Campi Flegrei, coltivato a tre differenti pH (0,0; 1,5; 2,5).

A partire da questi tre istogrammi e dagli altri qui non riportati, abbiamo ottenuto il valore medio del diametro cellulare nelle 108 colture studiate.

Nella Tab. 2 abbiamo riportato i valori del diametro cellulare medio dei 18 ceppi di *C. caldarium forma B*, coltivati ciascuno a sei differenti pH.

Nella Fig. 3 abbiamo quindi riportato, a titolo di esempio, i grafici che rappresentano le variazioni del diametro cellulare medio al variare del pH, relativi a tre di questi ceppi (Sciacca, Campi Flegrei, Rapolano Terme).

La Tab. 2 e le Figg. 2 e 3 dimostrano che le dimensioni del diametro cellulare di *C. caldarium forma B* variano al variare del pH; tale variazione è la risultante della influenza della concentrazione idrogenionica su diversi aspetti del metabolismo delle cellule. Da un lato si constata un leggero aumento del diametro di tutte le cellule ai valori ottimali di pH (cfr. Fig. 2 *b*); dall'altro lato, ai valori non ottimali di pH, si constata una inibizione della divisione cellulare, con conseguente accumulo di cellule di grandi dimensioni (cioè nella fase precedente la formazione delle autospore; cfr. Fig. 2 *a* e *c*) e quindi un netto aumento del diametro cellulare medio.

Globalmente, quindi, si osservano alti valori del diametro cellulare medio sia in corrispondenza del pH ottimale (1,5), sia, e soprattutto, in corrispondenza dei valori estremi di pH da noi presi in considerazione (0,0; 2,5).

Il grafico delle variazioni del diametro cellulare medio in funzione del pH assume quindi, nella quasi totalità dei casi, la forma di una W (cfr. Fig. 3).

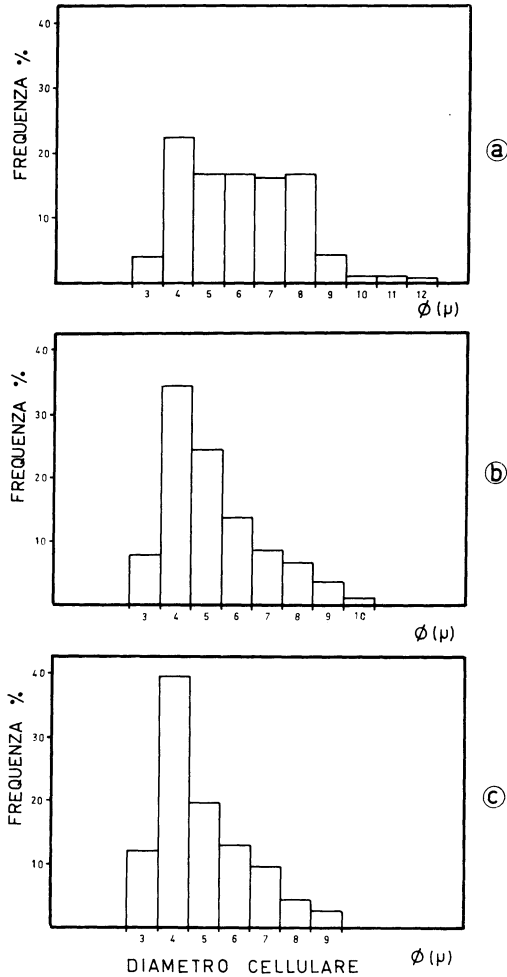


Fig. 2. Istogrammi di frequenza relativi al diametro cellulare dell'alga *Cyanidium caldarium* forma B (ceppo proveniente dai Campi Flegrei), coltivata a pH = 0,0 (a); a pH = 1,5 (b); a pH = 2,5 (c).

Si noti come il diametro cellulare sia fortemente influenzato dal pH del terreno di coltura: appare, soprattutto, molto evidente l'accumulo di cellule di grandi dimensioni ai pH non ottimali (a pH = 0,0 e, in misura molto minore, a pH = 2,5), fenomeno che sta ad indicare una inibizione della divisione cellulare.

Questi tre istogrammi sono stati scelti, come esempio, fra tutti quelli considerati nel presente lavoro, ma non riportati (18 ceppi diversi dell'alga coltivati a 6 differenti pH).

localita' di provenienza	p H					
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Sciacca	8,1	6,4	6,8	7,1	6,4	6,6
Castellammare d. Golfo	5,7	4,5	4,7	5,3	4,3	4,5
Sclafani Bagni	5,4	5,0	5,6	5,2	5,1	5,2
Terme Luigiane	6,8	5,7	5,5	6,0	6,0	5,5
Cerchiara di Calabria	6,6	5,3	5,5	5,5	6,1	6,9
Bagni Contursi	5,4	4,6	4,9	5,0	4,7	4,7
Telese	5,9	5,1	4,5	4,2	4,5	4,4
Isola d' Ischia	6,2	5,8	4,6	4,7	4,6	5,2
Campi Flegrei	6,0	5,7	5,1	5,2	4,6	4,9
Acquasanta Terme	6,0	5,5	4,9	5,2	4,6	4,9
Bagni di Tivoli	7,3	6,3	6,2	6,3	6,2	6,0
Bagni di Stigliano	5,1	5,0	4,9	5,1	4,5	4,2
Civitavecchia	6,7	5,7	5,8	5,4	5,8	6,5
Orbetello	5,4	5,3	4,6	5,0	4,8	5,0
Saturnia	5,6	4,5	4,7	5,0	4,5	4,5
Bagni San Filippo	5,3	4,8	4,8	4,7	4,2	4,5
Rapolano Terme	5,5	5,0	4,5	4,7	4,2	4,5
Sasso Pisano	4,7	4,7	4,2	4,4	4,3	4,0
diametro cellulare medio						

Tabella 2

Va inoltre messo in evidenza che i diversi ceppi di *C. caldarium forma B*, provenienti da diciotto diverse località italiane, posti nelle stesse condizioni colturali, presentano decise differenze morfologiche, qui evidenziate sotto l'aspetto « diametro cellulare »

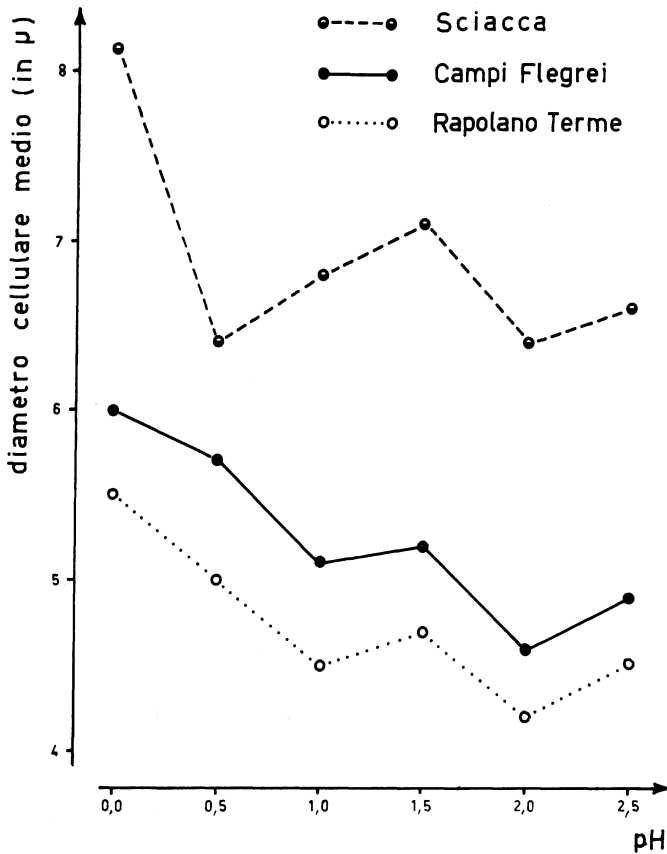


Fig. 3. Diametro cellulare medio dell'alga *Cyanidium caldarium forma B* in funzione del pH del terreno di coltura, in tre ceppi dell'alga provenienti da tre località italiane: Sciacca, Campi Flegrei, Rapolano Terme.

Per gli altri ceppi dell'alga, studiati nel presente lavoro, vedi Tabella 2.

Si noti che esistono apprezzabili differenze fra i vari ceppi dell'alga e che l'andamento del grafico assume approssimativamente, in ciascun ceppo, la forma di una W.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro si può osservare, in primo luogo, che i ceppi dell'alga *Cyanidium caldarium forma B*, provenienti da 18 diverse località italiane, sono tutti decisamente acidofili, tutti presentando l'optimum di crescita intorno a $\text{pH} = 1,5$.

I risultati del presente lavoro mettono inoltre in evidenza che l'alga *C. caldarium forma B* presenta una notevole variabilità, almeno relativamente al diametro cellulare, sia in dipendenza dalle condizioni ambientali(*) (nel presente lavoro è stato preso in considerazione il pH del mezzo di coltura), sia a seconda della provenienza dei ceppi studiati (diciotto località italiane).

L'intervallo di variabilità del diametro cellulare di *C. caldarium forma B* risulta molto più ampio di quelli indicati da TILDEN (4-6 μ) per il *Protococcus botryoides f. caldarius* dello Yellowstone Park (U.S.A.) e da GEITLER (2-6 μ) per il *Cyanidium caldarium* di Giava e Sumatra, anche se, in opportune condizioni colturali (cfr. ad es. la Fig. 2 b), quasi tutti i ceppi possono essere fatti rientrare, ragionevolmente, nei limiti indicati da questi due Autori.

La grande variabilità dell'alga dimostra ancora una volta la necessità di una revisione sistematica della specie *C. caldarium*, le cui descrizioni originali risultano attualmente insoddisfacenti.

La necessità di tale revisione fu già messa in evidenza in seguito alla scoperta della esistenza di due alghe acidofile e termofile, entrambe riferibili alla specie *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler sulla base delle descrizioni degli Autori, ma senz'altro ben diverse tra loro per caratteristiche ultrastrutturali (CASTALDO 1968 e 1970) e fisiologiche (DE LUCA, TADDEI 1970 e 1972; DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI 1972); a tali due alghe furono assegnati i nomi provvisori *C. caldarium forma A* e *C. caldarium forma B* (DE LUCA, TADDEI, 1970).

(*) vedi anche la prima nota a pag. 143.

RIASSUNTO

Nel presente lavoro è stata studiata l'alga *Cyanidium caldarium forma B* in 18 ceppi provenienti da altrettante località italiane; l'acidofilia dell'alga è stata confermata in tutti questi ceppi.

Il diametro cellulare dell'alga presenta una notevole variabilità, sia al variare del pH del mezzo di coltura, sia a seconda della provenienza dei singoli ceppi.

L'intervallo di variabilità del diametro cellulare di *C. caldarium forma B* risulta così molto più ampio di quelli indicati da TILDEN per *Protococcus botryoides f. caldarius* e da GEITLER per *Cyanidium caldarium*, anche se, in opportune condizioni colturali, quasi tutti i ceppi studiati possono essere fatti rientrare ragionevolmente nei limiti indicati da questi due Autori.

Gli AA. sottolineano quindi la necessità di una revisione della specie *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler, non solo per quanto concerne l'intervallo di variabilità del diametro cellulare, ma sulla base di tutte le ricerche morfologiche e fisiologiche eseguite sull'alga negli ultimi anni.

SUMMARY

In this paper *Cyanidium caldarium forma B* has been examined in 18 strains from various sources; its acidophily has found confirmation in all of them.

The cell diameter of the alga shows a fair variability, according to both variations of pH in the culture medium and the provenance of the strains.

The variability interval in cell diameter of *C. caldarium forma B* therefore appears much wider than that reported by TILDEN for *Protococcus botryoides f. caldarius* and by GEITLER for *Cyanidium caldarium*, even though, in suitable cultural conditions, almost all the strains examined can reasonably fall within the limits shown by these two scholars.

The authors therefore emphasize the need to revise the species *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler, not only insofar as the variability interval of cell diameter is concerned, but also on account of the many morphological and physiological researches recently carried out on that alga.

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 (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., A. MORETTI, A. MUSACCHIO, R. TADDEI, 1974. *Due forme di « Cyanidium caldarium » presenti in una stazione italiana già segnalata da G. Meneghini nel 1839*. Delpinoa, **14-15**: 3-10.
- DE LUCA P., A. MORETTI, R. TADDEI, 1974. *Nuove stazioni di « Cyanidium caldarium » nell'Italia meridionale e in Sicilia*. Delpinoa, **14-15**: 49-60.
- DE LUCA P., A. MUSACCHIO, R. TADDEI, 1972. *Diverso comportamento in eterotrofia delle due forme di « Cyanidium caldarium » dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, **12-13**: 19-27.
- DE LUCA P., R. TADDEI, 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium?* Delpinoa, **10-11**: 79-89.
- , 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.
- GEITLER L., F. RUTTNER, 1935. *Die Cyanophyceen der deutschen limnologischen Sunda Expedition, ecc.* Arch. Hydrobiol., suppl. **14**: 371-481.
- PINTO G., R. TADDEI, 1975. *Nuove stazioni italiane di « Cyanidium caldarium »*. Delpinoa, **14-15**: 125-139.
- TILDEN J. E., 1898. *Observations on some West American thermal algae*. Bot. Gaz. **26**: 89-105.