

Raffaele Gambardella *

Aldo Moretti *

Aldo Musacchio **

Autoecologia ed ultrastruttura di alghe termoacidofile del nord e centro America

Molti Autori hanno riportato la presenza di un'alga unicellulare eucariotica presso gli ambienti termali ed acidi di diverse parti del mondo. Tutti erano stati concordi nell'attribuire questa alga ad un'unica specie, in un primo tempo indicata con nomi diversi e successivamente denominata *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler (MENEGHINI, 1839; TILDEN, 1898; GALDIERI, 1899; GEITLER, 1932; GEITLER, RUTTNER, 1935; HIROSE, 1947; SECKBACH, 1972).

In seguito a studi effettuati da ricercatori dell'Istituto di Botanica di Napoli (Italia), su materiale prelevato alla solfatara dei Campi Flegrei di Napoli (Italia) e presso le fumarole dell'isola di Giava (Indonesia) (*locus classicus* di *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler), risultò che alla specie *C. caldarium* erano state attribuite, erroneamente, popolazioni miste di due alghe, simili per morfologia ma chiaramente differenti per ultrastruttura, fisiologia e per alcuni caratteri ecologici. Le due alghe risultarono pertanto attribuibili a taxa nettamente distinti e, dopo essere state indicate provvisoriamente come *Cyanidium caldarium forma A* e *Cyanidium caldarium forma B*, vennero classificate come *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler e *Pleurococcus sulphurarius* Galdieri (CASTALDO, 1970; DE LUCA, TADDEI, 1970; DE LUCA, TADDEI, 1972; DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI, 1972; DE LUCA, TADDEI, 1976; DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI, 1980).

* Istituto di Botanica, Facoltà di Scienze, Università di Napoli, Napoli (Italia).

** Dipartimento di Ecologia, Facoltà di Scienze, Università della Calabria, Cosenza (Italia).

Per quanto riguarda lo studio delle alghe termoacidofile del continente americano, da materiale raccolto presso ambienti termali ed acidi del nord e centro America sono stati isolati numerosi ceppi di alghe termoacidofile. Sulla base delle loro caratteristiche morfologiche i ceppi furono attribuiti a *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler e a *Pleurococcus sulphurarius* Galdieri. Lo studio ultrastrutturale, effettuato esclusivamente sui ceppi dello Yellowstone National Park (U.S.A.), dimostrò che le due specie del nord America presentavano caratteri ultrastrutturali del tutto coincidenti con quelli di *C. caldarium* e *P. sulphurarius* dei Campi Flegrei di Napoli (Italia) (DE LUCA, GAMBARDILLA, MEROLA, 1979).

Nel presente lavoro, al fine di apportare un contributo alla risoluzione della problematica tassonomica delle due alghe termoacidofile, viene esteso lo studio ultrastrutturale delle alghe americane ai ceppi del centro America, per verificare se anche questi presentino gli aspetti ultrastrutturali già noti per le alghe dello Yellowstone National Park e dei Campi Flegrei di Napoli.

Con lo stesso fine vengono analizzati i caratteri autoecologici dei ceppi del nord e centro America, di cui si conoscono solo alcuni dati riferiti allo Yellowstone National Park (ALLEN, 1959). Gli aspetti autoecologici, inoltre, vengono discussi comparativamente con quelli dei ceppi studiati in ambienti termali ed acidi di altri continenti.

MATERIALE E METODI

Sono stati utilizzati i seguenti sette ceppi di alghe termoacidofile della collezione di alghe dell'Istituto di Botanica di Napoli (Italia): ceppo n. 139 di *Cyanidium caldarium* e ceppo n. 140 di *Pleurococcus sulphurarius* provenienti dallo Yellowstone National Park (U.S.A.); ceppo n. 137 di *C. caldarium* e ceppo n. 138 di *P. sulphurarius* provenienti da Playon de Ahuachapan (El Salvador); ceppo n. 134 di *C. caldarium* e ceppo

n. 135 di *P. sulphurarius* provenienti da Los Azufres (Messico); ceppo n. 136 di *P. sulphurarius* proveniente da Cerro Prieto (Messico).

Per gli studi ultrastrutturali le alghe sono state fissate con KMnO_4 al 2% in acqua, per 1 h, a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi sono state disidratate con etanolo a concentrazioni crescenti e con ossido di propilene, quindi incluse in Epon 812. Le sezioni, ottenute con un ultramicrotomo Ultratome III (LKB), colorate con acetato di uranile per 5' e citrato di piombo per 5', sono state osservate con un microscopio elettronico Siemens Elmiskop 1A, presso il Centro di Studi di Microscopia Elettronica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

Le analisi autoecologiche sono state: ricerca del pH ottimale di crescita, aloresistenza, crescita su diverse fonti di azoto (ammoniacale o nitrico), crescita in eterotrofia.

Le prove sono state condotte utilizzando beute da 100 ml, contenenti 35 ml di terreno liquido di ALLEN (1959), a pH 1,5; il terreno di Allen, in alcuni casi, è stato modificato, come di seguito viene riportato.

Le beute sono state poste su di un piano oscillante di plexiglas ed illuminate dal basso da lampade Philips TLD 30 W/55, a luce continua di 8000 lux.

L'ambiente era termostato a 35°C.

La crescita delle alghe è stata controllata, ogni ventiquattro ore, mediante lettura ad un colorimetro Bausch & Lomb, alla lunghezza d'onda di 550 nm.

Per la ricerca del pH ottimale di crescita il pH del mezzo veniva regolato, con aggiunta di H_2SO_4 , ai valori di 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5.

Per le prove di aloresistenza sono state preparate colture con quantità di NaCl varianti dallo 0 al 13%, con intervalli di una unità.

Per la crescita su azoto ammoniacale il mezzo non subiva modificazioni; per la prova di crescita su azoto sotto forma nitrica il mezzo veniva modificato sostituendo $l'(NH_4)_2SO_4$ con $NaNO_3$ (0,85 g/l).

Le condizioni di crescita in eterotrofia si ottenevano aggiungendo glucosio (3 g/l) al mezzo e ponendo le beute al buio. Questo tipo di crescita è stato verificato, in parallelo, su mezzi contenenti azoto ammoniacale o azoto nitrico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le osservazioni al microscopio elettronico hanno dimostrato che tutti i ceppi centro-americani di *Cyanidium caldarium*, indipendentemente dalla loro provenienza, presentano le stesse caratteristiche ultrastrutturali già osservate nei ceppi dello Yellowstone National Park (U.S.A.) (DE LUCA, GAMBARDELLA, MEROLA, 1979) e nei ceppi dei Campi Flegrei di Napoli (CASTALDO, 1970). È stato osservato, infatti, un solo cloroplasto, a forma di coppa, con margini più a meno lobati, delimitato da una sola membrana e con tilacoidi disposti concentricamente e/o a spirale, un solo mitocondrio, la costante assenza del sistema vacuolare e la riproduzione rigorosamente per quattro endospore (Tavv. I b, II b).

Anche le peculiarità ultrastrutturali di *Pleurococcus sulphurarius*, già osservate nei ceppi nord-americani ed europei, prima menzionati, sono state verificate nei ceppi centro-americani di questa specie. È risultato, infatti, che esiste un solo cloroplasto, a forma di coppa e con margini lobati, delimitato da una sola membrana unitaria; uno, due e anche tre tilacoidi, disposti concentricamente e paralleli alla membrana unitaria, formano come una sorta di ulteriore delimitazione per i tilacoidi più interni, che decorrono paralleli fra di loro e all'asse maggiore del plastidio. I mitocondri sono sempre più di uno, il sistema vacuolare è molto ben sviluppato e la riproduzione av-

viene con formazione di quattro, o multipli di quattro, endospore (Tavv. I a, II a, III).

Rispetto ai ceppi nord-americani ed europei, un ceppo centro-americano di *C. caldarium* (Los Azufres, Messico) presenta una maggiore quantità di globuli elettrocondensanti, probabilmente lipidici (Tav. II b) e tutti i ceppi centro-americani di *P. sulphu-*

		pH ottimale di crescita	Aloresistenza
PLEUROCOCCUS SULPHURARIUS	Y.N.Park (U.S.A.)	1,1	9
	Ahuachapan (El Salvador)	1,1	9
	Los Azufres (Messico)	1,3	8
	Cerro Prieto (Messico)	1,5	10
CYANIDIUM CALDARIUM	Y.N.Park (U.S.A.)	1,2	3
	Ahuachapan (El Salvador)	1,2	4
	Los Azufres (Messico)	1,2	4

Tab. I - pH ottimali di crescita e limiti di aloresistenza (espressi in concentrazioni % di NaCl) di ceppi di *Pleurococcus sulphurarius* e *Cyanidium caldarium* del nord e centro America.

rarius presentano il vacuolo molto più sviluppato. In entrambi i casi tali variazioni sono da attribuire, come precedentemente dimostrato (DE LUCA, GAMBARDELLA, MEROLA, 1979), al fatto che le colture dei ceppi centro-americani, utilizzati nel presente studio, si trovavano in fase stazionaria di crescita.

I valori dei pH ottimali di crescita dei ceppi americani sono risultati compresi tra 1,1 e 1,5 per i ceppi di *P. sulphurarius* e di 1,2 per i ceppi di *C. caldarium* (Tab. I).

Per i ceppi delle due specie dei Campi Flegrei di Napoli sono stati riportati valori analoghi, compresi tra 1,1 e 2,0 (RIGANO, TADDEI, 1968; DE LUCA, TADDEI, 1970; DE LUCA, TADDEI, 1976).

I dati relativi all'aloeresistenza mostrano che i ceppi americani di *P. sulphurarius* presentano una chiara capacità di resistenza alle alte concentrazioni di NaCl (9-10%), mentre i ceppi di *C. caldarium* presentano valori di aloeresistenza nettamente più bassi (3-4%) (Tab. I).

Risultati simili sono stati ottenuti per i ceppi di *P. sulphurarius* e *C. caldarium* dei Campi Flegrei di Napoli (10% e 3% rispettivamente) (MUSACCHIO, PINTO, SABATO, TADDEI, 1978) e dell'isola di Giava (Indonesia) (10% e 4% rispettivamente) (DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI, 1980).

Le prove di crescita su diverse fonti di azoto, relative alle specie americane, mostrano che tutti i ceppi sono in grado di utilizzare sia la forma ammoniacale che quella nitrica, con l'unica eccezione di *C. caldarium* di Los Azufres (Messico) che non ha presentato crescita in presenza di azoto nitrico. Dall'analisi dei valori delle costanti di crescita (K), risulta che tutte le alghe presentano una crescita migliore quando possono utilizzare il sale di ammonio come sorgente azotata (Tab. II).

Il confronto tra i ceppi americani e quelli europei ed asiatici pone in evidenza un diverso comportamento, relativamente alla utilizzazione della forma nitrica dell'azoto. Per i Campi Flegrei di Napoli è risultato che un ceppo di *C. caldarium* utilizza la forma nitrica dell'azoto, al contrario di un ceppo di *P. sulphurarius* che non riesce ad utilizzarla (DE LUCA, TADDEI, 1972; DE LUCA, TADDEI, 1976). Analogo comportamento presen-

tano un ceppo di *C. caldarium* ed un ceppo di *P. sulphurarius* delle fumarole di Giava (DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI, 1980). Per il Giappone, infine, un ceppo di un'alga termoacidofila, che risultò riferibile a *C. caldarium* (DE LUCA, TADDEI, 1976), riesce ad utilizzare la forma nitrica dell'azoto (FUKUDA, 1958).

Il dato riguardante la capacità di utilizzare la forma nitrica dell'azoto, manifestata dal ceppo n. 140 di *P. sulphurarius*

		AUTOTROFIA		ETEROTROFIA	
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
PLEUROCOCOCCUS SULPHURARIUS	Y.N.Park (U.S.A.)	10,2	4,1	17,2	3,8
	Ahuachapan (El Salvador)	9,3	3,5	16,3	3,4
	Los Azufres (Messico)	8,0	3,7	15,2	3,6
	Cerro Prieto (Messico)	11,1	3,2	18,7	3,3
CYANIDIUM CALDARIUM	Y.N.Park (U.S.A.)	9,8	4,5	---	---
	Ahuachapan (El Salvador)	9,5	3,0	---	---
	Los Azufres (Messico)	8,2	---	---	---

Tab. II - Costanti di crescita (K) in condizioni di autotrofia (ammonio o nitrato) e di eterotrofia (ammonio o nitrato) di ceppi di *Pleurococcus sulphurarius* e *Cyanidium caldarium* del nord e centro America.

dello Yellowstone National Park, da noi esaminato in questo lavoro, risulta in contrasto con quanto in precedenza riportato da ALLEN (1959). Secondo questo Autore, infatti, il ceppo n. 1355/1, che corrisponde a *P. sulphurarius* (DE LUCA, GAMBARDELLA, MEROLA, 1979), da lui isolato dalle fumarole dello Yellowstone National Park, non è in grado di utilizzare l'azoto nitrico. È interessante notare, a questo proposito, che anche presso i Campi Flegrei di Napoli sono presenti ceppi di *P. sulphurarius* capaci (Gambardella, dato non pubblicato) o meno (DE LUCA, TADDEI, 1972) di utilizzare la forma nitrica dell'azoto.

La capacità di assimilare nitrato, risultata discordante non solo per ceppi della stessa specie provenienti da continenti diversi, ma addirittura per ceppi isolati presso la stessa stazione, non è, pertanto, da ritenersi un carattere sistematico distintivo a livello di specie, ma è da interpretarsi come una espressione di variabilità intraspecifica.

Le prove di crescita in eterotrofia delle due specie americane mostrano che nessuno dei ceppi di *C. caldarium* riesce a sopravvivere in queste condizioni, sia in presenza di ammonio che in presenza di nitrato. Al contrario, i ceppi di *P. sulphurarius* crescono in eterotrofia, in presenza dell'una o dell'altra forma dell'azoto. Tra le due forme, quella ammoniacale ha determinato la crescita migliore, che è risultata superiore anche a quella presentata da questa specie in condizioni di autotrofia (Tab. II).

Un comportamento del tutto analogo è riscontrabile nei ceppi di *C. caldarium* e *P. sulphurarius* dei Campi Flegrei di Napoli (DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI, 1972; DE LUCA, TADDEI, 1976) e nei ceppi di Giava (DE LUCA, MUSACCHIO, TADDEI, 1980).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente lavoro mostrano che, relativamente a ciascuna specie, i ceppi di *Cyanidium caldarium* e di *Pleurococcus sulphurarius*, provenienti da differenti località del nord e centro America, presentano una precisa corrispondenza ultrastrutturale e fisiologica.

Una analoga corrispondenza risulta dal confronto tra le due specie termoacidofile americane e le alghe di ambienti termali ed acidi di altri continenti.

Fa eccezione soltanto la capacità o meno di assimilare l'azoto sotto forma nitrica, che è da attribuirsi ad una espressione di variabilità intraspecifica, osservata, tra l'altro, anche per ceppi della stessa specie isolati presso la stessa località.

L'uniformità morfologica e fisiologica di ciascuna delle due specie termoacidofile risulta di grande interesse se si considera che *C. caldarium* e *P. sulphurarius* sono specie a distribuzione cosmopolita, ma, nello stesso tempo, puntiforme. Appare quindi molto probabile che tale uniformità sia strettamente dipendente dai fattori microambientali che caratterizzano in modo specifico ed univoco tutte le stazioni termali ed acide del mondo, indipendentemente dalla loro localizzazione geografica.

RIASSUNTO

È stato effettuato uno studio autoecologico su diversi ceppi delle due alghe termoacidofile *Cyanidium caldarium* e *Pleurococcus sulphurarius*, provenienti da ambienti solfatarici del nord e centro America. Uno studio ultrastrutturale ha riguardato i ceppi del centro America.

Gli studi autoecologici hanno mostrato che i ceppi di ciascuna specie presentano una evidente uniformità per quanto riguarda i valori di pH ottimale di crescita, di aloresistenza e di crescita in condizioni di eterotrofia.

I dati ottenuti sono risultati coincidenti con quelli già noti per le due alghe termoacidofile di altri continenti (Europa ed Asia).

Uniformi sono risultate anche le caratteristiche ultrastrutturali dei ceppi di ciascuna specie del continente americano ed europeo.

SUMMARY

Strains of the thermoacidophilic algae *Cyanidium caldarium* and *Pleurococcus sulphurarius* coming from North and Central America were examined from the autoecological point of view. An ultrastructural study was carried for the Central American strains.

The autoecological studies showed that the strains of each species are very uniform as regards acidophily, salt-tolerance and growth in heterotrophic conditions. Their physiological responses, furthermore, resulted like those of the respective thermoacidophilic algae coming from European and Asian acid hot springs.

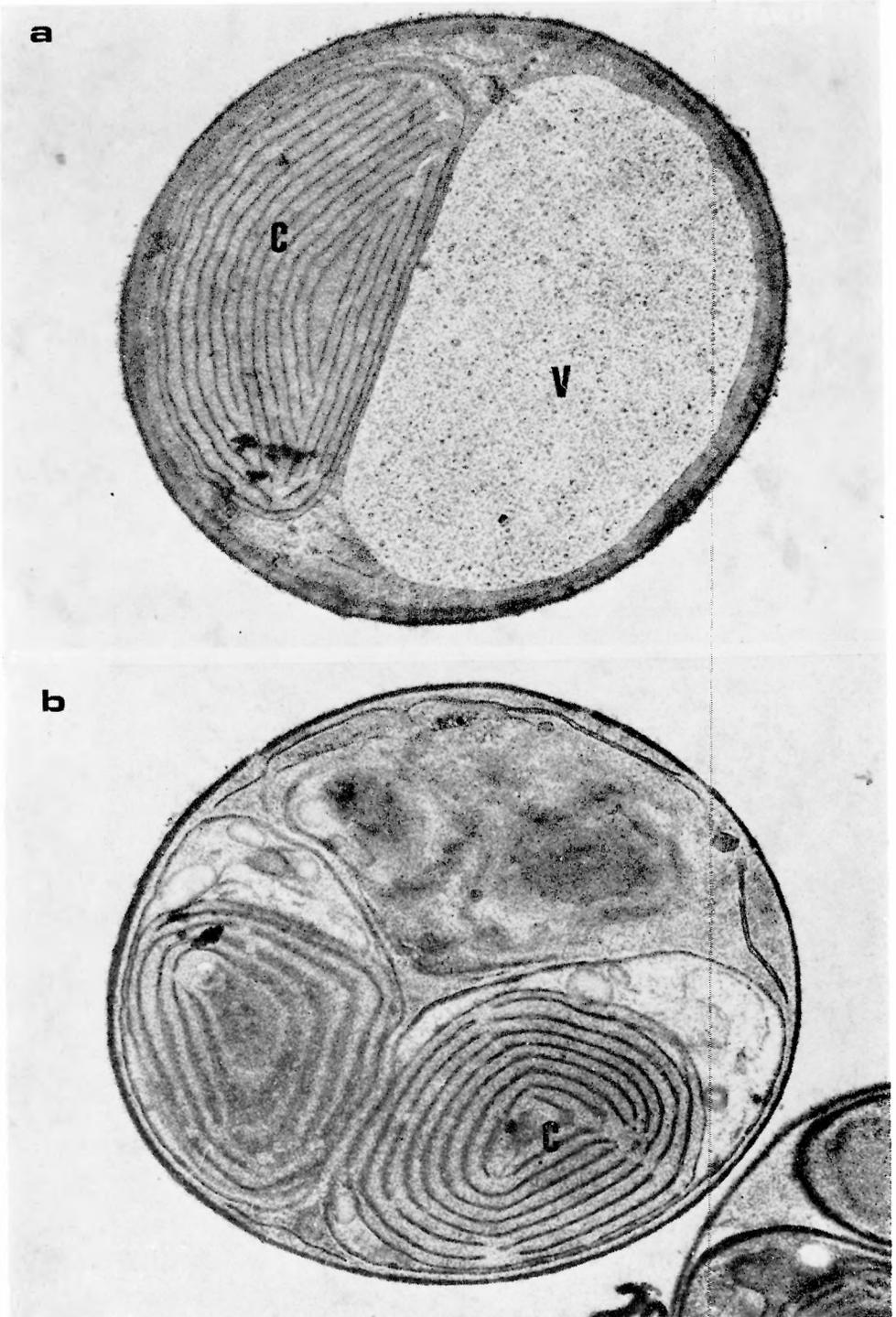
The ultrastructural studies confirmed the uniformity existing among all the strains of each species coming from the American and European continents.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. B., 1959. *Studies with an anomalously pigmented chlorophyte*. Arch. Mikrobiol., 32: 270-277.
- CASTALDO R., 1970. *Ultrastruttura di due forme isolate dalle popolazioni di Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler*. Delpinoa, 10-11: 91-109.
- DE LUCA P., GAMBARDILLA R., MEROLA A., 1979. *Thermoacidophilic algae of North and Central America*. Bot. Gaz., 140 (4): 418-427.
- DE LUCA P., MUSACCHIO A., TADDEI R., 1972. *Diverso comportamento in eterotrofia delle due forme di «Cyanidium caldarium» dei Campi Flegrei (Napoli)*. Delpinoa, 12-13: 19-27.
- DE LUCA P., MUSACCHIO A., TADDEI R., 1980. *Acidophilic algae from the fumaroles of mount Lawu (Java), locus classicus of Cyanidium caldarium Geitler*. Giorn. Bot. Ital., in stampa.
- DE LUCA P., TADDEI R., 1970. *Due alghe delle fumarole acide dei Campi Flegrei (Napoli): Cyanidium caldarium? Delpinoa, 10-11: 79-89.*
- DE LUCA P., TADDEI R., 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.
- DE LUCA P., TADDEI R., 1976. *On the necessity of a systematic revision of the thermal acidophilic alga «Cyanidium caldarium» (Tilden) Geitler*. Webbia, 30 (1): 197-218.
- FUKUDA I., 1958. *Physiological studies on a thermophilic blue green Cyanidium caldarium*. Bot. Mag., 71: 79-86.
- GALDIERI A., 1899. *Su di un'alga che cresce intorno alle fumarole della solfatara*. Rend. R. Accad. Sc. Fis. Mat. Napoli, 6: 160-164.
- GEITLER L., 1932. *Cyanophyceae*. In: RABENHORST L., *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterreich und der Schweiz*. 14: 1-1196.
- GEITLER L., RUTTNER F., 1935. *Die Cyanophyceen der deutschen limnologischen Sunda Expedition, etc*. Arch. Hydrobiol., suppl. 14: 371-481.
- HIROSE H., 1947. *On the plastid of the special blue-green alga Cyanidium*. Science and Scientific Education, 1: 43-45.
- MENEGHINI G., 1839. *Nuova specie di alga*. Nuovo Giornale de' Letterati, 39: 67-68.
- MUSACCHIO A., PINTO G., SABATO S., TADDEI R., 1978. *Aloresistenza in diversi ceppi di Cyanidium caldarium forma A e forma B*. Delpinoa, 18-19: 37-44.
- RIGANO C., TADDEI R., 1968. *Estrema acido-resistenza dell'alga Cyanidium caldarium (Tilden) Geitler vivente alla solfatara di Pozzuoli (Napoli)*. Delpinoa, 8-9: 57-63.
- SECKBACH J., 1972. *On the fine structure of the acidophilic hot-spring alga Cyanidium caldarium: a taxonomic approach*. Microbios, 5: 133-142.
- TILDEN J., 1898. *Observations on some west american thermal algae*. Bot. Gaz., 26: 89-105.

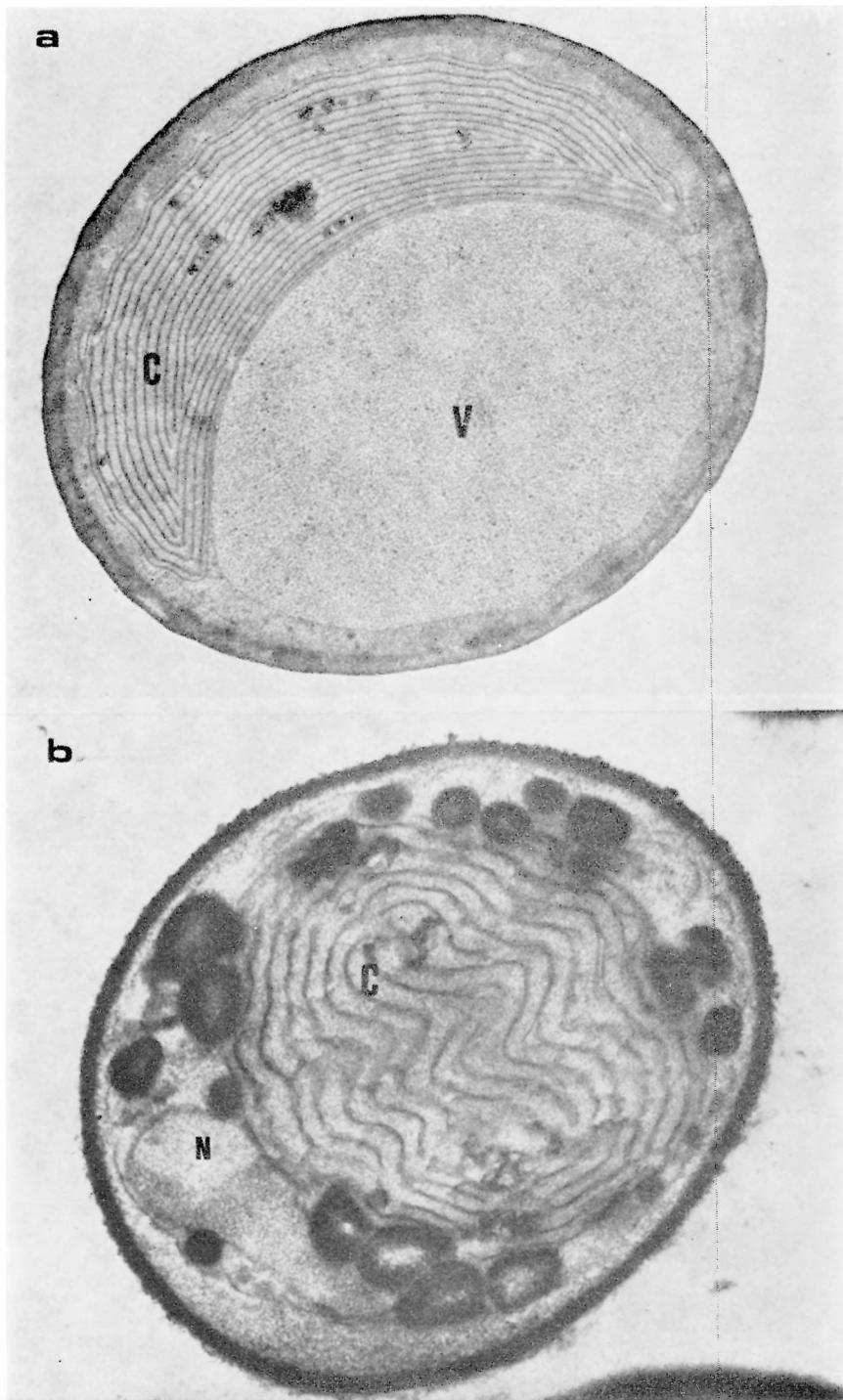
TAV. I

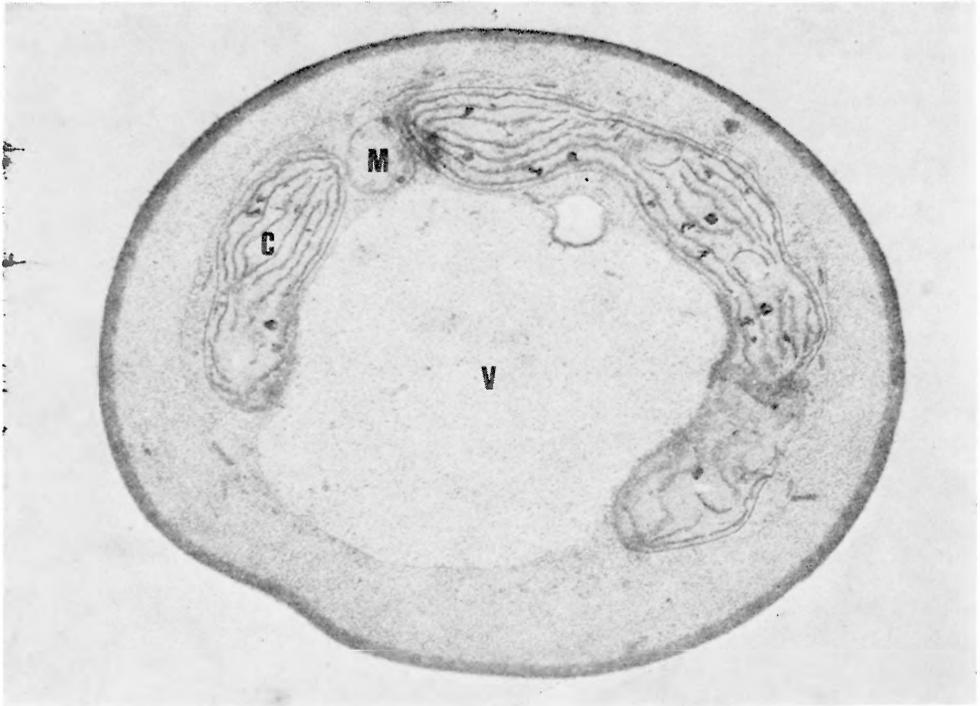
- a - *Pleurococcus sulphurarius* di Playon de Ahuachapan (El Salvador).
Si noti il cloroplasto (C) delimitato da membrana semplice; i tilacoidi esterni sono disposti concentricamente, quelli interni sono paralleli fra loro e all'asse maggiore del plastidio. Un solo grosso vacuolo (V) occupa quasi tutto il restante citoplasma. (x 22.000)
- b - Uno sporangio di *Cyanidium caldarium* di Playon de Ahuachapan (El Salvador). Si noti l'assenza di vacuolo nelle endospore e la particolare disposizione dei tilacoidi del cloroplasto (C). (x 20.000)



TAV. II

- a - *Pleurococcus sulphurarius* di Los Azufres (Messico). Le sue caratteristiche ultrastrutturali sono le stesse del ceppo di *P. sulphurarius* di Playon de Ahuachapan (El Salvador). (C) cloroplasto, (V) vacuolo. (x 15.000).
- b - *Cyanidium caldarium* di Los Azufres (Messico). Si noti l'assenza di vacuolo. Il cloroplasto (C), delimitato da membrana semplice, presenta i tilacoidi disposti concentricamente e/o a spirale. Numerosi globuli osmofili sono presenti nel citoplasma periferico che contiene anche il nucleo (N). (x 32.000)





Pleurococcus sulphurarius di Cerro Prieto (Messico). Perifericamente al
grosso vacuolo centrale (V) sono visibili due lobi del cloroplasto (C) e un
mitocondrio (M). (x 12.000)