

## Morfologia e diazotrofia di cianobatteri di laghi dell'Italia meridionale

ALDO MUSACCHIO \* GESUALDO SINISCALCO GIGLIANO \*\*

\* Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria,  
Rende (Cosenza), Italia.

\*\* Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Napoli,  
Via Foria 223, Napoli, Italia.

### Summary

The authors report on the isolation of five *Anabaena* strains from southern Italian lakes and include descriptions of their morphological and cultural features. For biological and practical purposes acetylene reduction by the *Anabaena* strains was tested with respect to the effects of the temperature, light intensity, and incubation time on nitrogenase activity.

### INTRODUZIONE

Una sempre maggiore attenzione viene rivolta in questi ultimi anni allo studio degli organismi azotofissatori, sia liberi che simbiotici, per una loro più efficiente utilizzazione in agricoltura. Questo interesse è sollecitato sia da considerazioni ecologiche, in quanto questi organismi costituiscono una fonte di azoto « naturalmente rinnovabile », sia da considerazioni economiche legate al costo crescente dei fertilizzanti (HORNE, 1977; WHITTON & CARR, 1982).

L'introduzione della tecnica gascromatografica per la misura dell'attività nitrogenasica, ha reso più agevole questo tipo di

---

Key words: Cyanobacteria, fresh water, *Anabaena*, N<sub>2</sub>-fixation.

Lavoro eseguito con il contributo del CNR nell'ambito del P.F. IPRA-sottoprogetto  
1. Pubblicazione N. 683.

studio ed ha permesso di ottenere dati più precisi su organismi e su sistemi per quanto riguarda la ricerca biologica sia di base che applicata.

Il nostro gruppo di ricerca, che collabora al progetto CNR per l'Incremento della Produttività delle Risorse Agricole (I.P.R.A.), ha già affrontato aspetti che riguardano la fissazione dell'azoto di attinomiceti simbiotici di piante non leguminose (MORETTI *et al.*, 1982), di cianobatteri simbiotici di *Azolla* (BOZZINI *et al.*, 1984) e di *Rhizobium* simbiotici dei fusti di *Sesbania rostrata* (BOZZINI *et al.*, 1983).

Al fine di esaminare gli aspetti ecologici, fisiologici ed applicativi di organismi azotofissatori non simbiotici, il nostro gruppo si sta interessando inoltre allo studio di cianobatteri viventi liberi. Nel presente lavoro vengono riportati dati sull'isolamento, sulla morfologia e sull'attività nitrogenasica di cianobatteri azotofissatori isolati da laghi della Basilicata e della Calabria.

## MATERIALE E METODI

### *Raccolta ed isolamento delle alghe*

Nell'estate del 1982 furono effettuati prelievi di acque superficiali dai seguenti laghi: Angitola (Calabria), Abate Alonia, Monticchio e Pertusillo (Basilicata). Di questi laghi solo il Monticchio è naturale mentre gli altri sono bacini artificiali. La temperatura ed il pH al momento del prelievo risultarono per Abate Alonia di 22°C e 8,4 rispettivamente; per Angitola di 20°C e 7,8; per Monticchio di 21°C e 8,6; per Pertusillo di 19°C e 8,2.

I trapianti furono eseguiti in terreni di coltura liquidi, selettivi per i cianobatteri, in condizioni di crescita diverse per quanto riguarda illuminazione (intensità, luce continua o ciclo notte-giorno) e modifiche dei terreni utilizzati (pH, oligoelementi, fattori di crescita). I terreni utilizzati furono i seguenti: Gerloff (GERLOFF *et al.*, 1950), Zehnder (CARR *et al.*, 1973), BG-11 (HUGHES *et al.*, 1958) ed ASM-1 (GORHAM *et al.*, 1964), con o senza azoto combinato.

Per ottenere colture monoalgali si fece uso di micropipette o si applicarono i metodi delle diluizioni, della piastratura e dell'innalzamento della temperatura (ALLEN, 1973).

### *Misura dell'attività nitrogenasica*

Per la misura dell'attività nitrogenasica i ceppi di cianobatteri furono tenuti in coltura in beute da 1000 ml contenenti 400 ml di terreno di Zehnder, a luce continua (3000 lux), in ambiente termostato (20°C) ed agitate occasionalmente. Le colture venivano analizzate dopo 15 giorni dall'inoculo.

L'incubazione fu effettuata in beute da 100 ml contenenti 20 ml della sospensione algale. Fu misurata l'attività nitrogenasica in funzione della temperatura (da 5° a 45°C con intervalli di 5°C), dell'intensità luminosa (100, 500, 1000, 1500, 2000, 3000 e 5000 lux) e del tempo di incubazione (fino a 72 ore). Per la misura dell'attività nitrogenasica fu utilizzata la tecnica di riduzione dell'acetilene (HARDY *et. al.*, 1968). Per queste misure, prima delle varie incubazioni, le beute venivano chiuse ermeticamente e mediante una siringa si sostituivano 8 ml di aria con 8 ml di acetilene. Il tempo di incubazione per le varie prove fu di 1 ora. Per il dosaggio dell'etilene prodotto dalla riduzione dell'acetilene, 1 ml di atmosfera della beuta veniva iniettato al gascromatografo. Fu utilizzato un gascromatografo PYE Unicam (Philips) con colonna di vetro di 1,5 m × 4 mm, impaccata con Silica Gel 100-120 mesh; la temperatura della colonna fu di 75°C, quella dell'iniettore e del FID detector di 100°C; il gas di trasporto fu azoto a 30 ml/min. I tempi di ritenzione dell'etilene prodotto furono comparati con quelli di uno standard puro di etilene. Furono tracciate le curve di calibrazione e determinati i fattori di correzione. Le aree dei picchi furono determinate con il metodo della triangolazione. Ciascuna prova venne ripetuta tre volte.

Per la determinazione del peso secco, dopo le varie prove, le beute con le sospensioni algali furono tenute in stufa a 130°C fino ad ottenere un peso costante.

## RISULTATI

### *Isolamento e osservazioni morfologiche*

Furono isolati cinque ceppi di cianobatteri: due dal lago di Monticchio ed uno da ciascuno dei rimanenti laghi. Uno dei ceppi di Monticchio (Monticchio 1) ed il ceppo di Angitola cresce-

vano sia sul terreno di Zehnder che su ASM-1 e vennero monoalgalizzati mediante il metodo dell'innalzamento della temperatura (32°C). Gli altri ceppi, invece, crescevano bene sul terreno di Zehnder e vennero monoalgalizzati isolando i singoli tricomi mediante l'uso di micropipette. Il terreno utilizzato per la crescita di tutti i cinque ceppi fu quello di Zehnder, modificato per l'eliminazione di  $Fe^{3+}$  in 0,1 N HCl, per la sostituzione di  $Ca(NO_3)_2$  con  $CaCl_2$  (4 mg/ml) ed elevando il pH da 7 a 7,6 con KOH 1N. Una buona crescita si ottenne in condizioni di luce continua a 3000 lux ed a 30°C. L'agitazione delle colture non influì sulla crescita.

Sulla base delle chiavi e delle descrizioni di BOURELLY (1970) e di HUBER-PESTALOZZI (1938) i cinque ceppi vennero assegnati a specie distinte del genere *Anabaena*. Di seguito sono descritte le caratteristiche morfologiche delle tre specie osservate al microscopio ottico, nonché alcune caratteristiche colturali.

*Anabaena* sp. (Monticchio 2) (Fig. 1a): tricomi isolati con guaina evidente, lunghi da 10-20 ad oltre 400  $\mu$ ; cellule vegetative a forma di barilotto o subsferiche, lunghe 8-10  $\mu$ , larghe 6-8  $\mu$ , con vacuoli gassosi e granulazioni; eterocisti sferiche con due noduli polari di 8-9  $\mu$  di diametro, presenti lungo tutto il filamento ogni 15-20 cellule vegetative; acineti ovoidali, lunghi 18-22  $\mu$ , larghi 10-14  $\mu$  e presenti isolatamente lungo tutto il filamento senza ordine apparente. In coltura liquida questo ceppo si presenta di colore verde chiaro, su agar in colonie omogenee, molto gelatinose, con tricomi paralleli spesso sovrapposti tra di loro.

*Anabaena* sp. (Abate Alonia e Pertusillo) (Fig. 1b): tricomi isolati, senza guaina o con guaina sottilissima, lunghi fino a 500  $\mu$ ; cellule vegetative di forma cilindrica con vacuoli gassosi, lunghe 5-8  $\mu$ , larghe 3-5  $\mu$ ; eterocisti ovoidali con due noduli polari, lunghe 6-8  $\mu$  e larghe 4-7  $\mu$ , presenti lungo tutto il tricoma ogni 10-20 cellule vegetative; acineti cilindrici a maturità e con estremità arrotondate, lunghi 15-20  $\mu$  e rigonfiati al centro durante lo sviluppo. In coltura liquida i tricomi tendono ad aggregarsi in piccole colonie flocculose di colore verde chiaro; il ceppo di Abate Alonia su agar diffonde poco mentre quello di Pertusillo non cresce quasi mai.

*Anabaena* sp. (Monticchio 1 e Angitola) (Fig. 1c): tricomi lunghi disposti quasi sempre paralleli in una matrice gelatinosa comune; colonie senza forma definita; cellule vegetative cilindri-

che, isodiametriche, di 6-8  $\mu$ ; eterocisti ellissoidali, con due noduli polari, lunghe 10  $\mu$ , larghe 6  $\mu$ ; acineti ovoidali, lunghi 8-12  $\mu$ , larghi 10-12  $\mu$ , originati per progressiva maturazione di tutte le cellule di un tricoma. Le colture liquide sono di colore verde-azzurro chiaro e le cellule formano colonie galleggianti; su agar crescono benissimo diffondendosi su tutta la superficie della piastra.

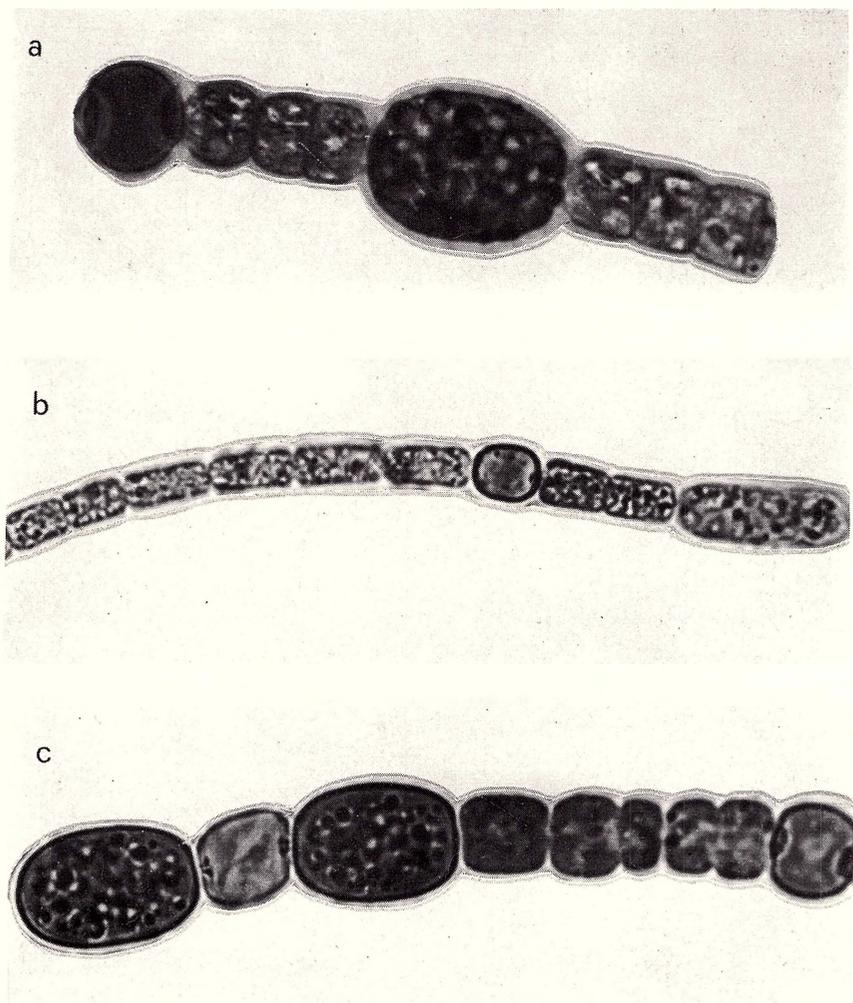


Fig. 1 — a) *Anabaena* sp. (Monticchio 2)  $\times$  4000.  
b) *Anabaena* sp. (Abate Alonia e Pertusillo)  $\times$  1600.  
c) *Anabaena* sp. (Monticchio 1 e Angitola)  $\times$  4000.

### *Attività nitrogenasica*

In Fig. 2 è riportata la variazione dell'attività nitrogenasica in funzione della temperatura (da 5° a 45°C, con intervalli di 5°C). Gli optimum di temperatura variano da 25° a 35°C. Alle temperature estreme l'attività nitrogenasica fu molto bassa o del tutto assente. Soltanto il ceppo di Abate Alonia presentò attività nitrogenasica apprezzabile a 5°C, corrispondente a circa il 25% dell'attività presentata all'optimum di temperatura.

I dati complessivi di questi esperimenti, come si può osservare dai diagrammi di Arrhenius riportati in Fig. 3, mostrano che l'attività nitrogenasica si manifesta in tutti i ceppi con risposta esponenziale da 5°C fino alla temperatura ottimale. Subito dopo aver raggiunto il massimo l'attività nitrogenasica decresce rapidamente (Fig. 2). Nei ceppi di Angitola e Monticchio 1 non vi è praticamente attività nitrogenasica a 45°C, negli altri ceppi invece l'attività è simile (Monticchio 2 e Pertusillo) o minore (Abate Alonia) a quella manifestata a 10°C. Il decrescere dell'attività nitrogenasica nei ceppi di Angitola e Monticchio 2 è molto più accentuato che negli altri ceppi.

Nella Fig. 4 è riportata l'attività nitrogenasica in funzione dell'intensità luminosa, nell'intervallo compreso tra 100 e 5000 lux, per i cinque ceppi incubati alle rispettive temperature ottimali. L'attività nitrogenasica è già notevole a basse intensità luminose; a circa 100 lux essa varia da un minimo di 16 nmoli/h/mg peso secco (in Monticchio 1) ad un massimo di 19 nmoli/h/mg peso secco (in Abate Alonia). L'attività nitrogenasica cresce rapidamente con l'aumentare dell'intensità luminosa fino a 1000-1500 lux. A valori superiori di intensità luminosa l'attività nitrogenasica si mantiene costante.

In Fig. 5 è riportata l'attività nitrogenasica di tutti i ceppi in funzione del tempo di incubazione alle rispettive temperature ottimali. L'attività nitrogenasica si presenta con andamento lineare per circa 12-20 ore, aumenta esponenzialmente da 20 a poco meno di 30 ore e declina lentamente per cessare quasi del tutto a circa 46 ore. L'attività alla fine della fase esponenziale fu di 5,0  $\mu$ moli C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg peso secco per il ceppo di Abate Alonia; di 5,8  $\mu$ moli C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg peso secco per il ceppo di Angitola; di 4,6  $\mu$ moli C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg peso secco per il ceppo di Monticchio 1; di 4,8  $\mu$ moli C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg peso secco per il ceppo di Monticchio 2; di 4,5  $\mu$ moli C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/mg peso secco per il ceppo di Pertusillo.

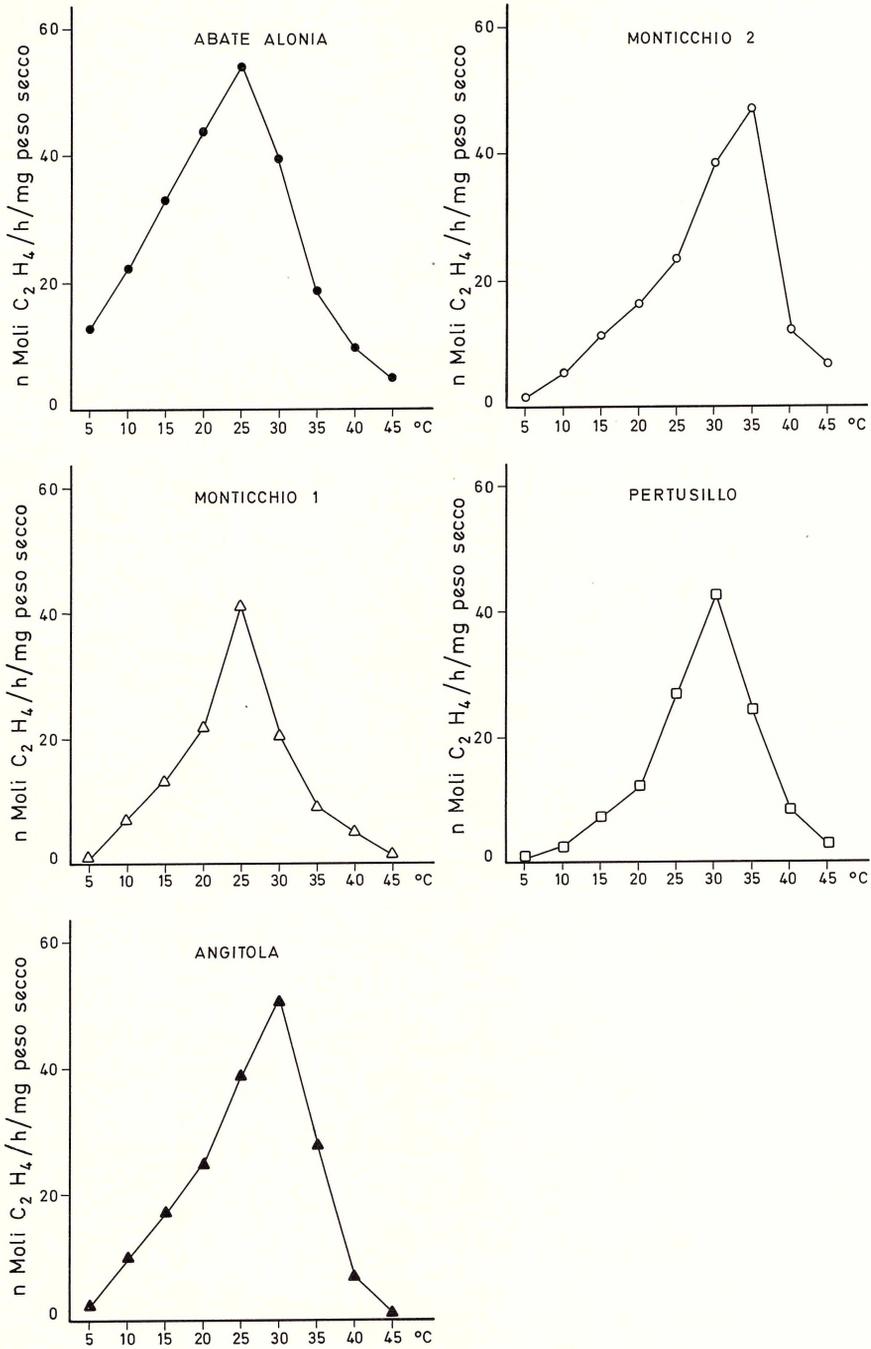


Fig. 2 — Effetto della temperatura sulla riduzione di acetilene in 5 ceppi di *Anabaena*.

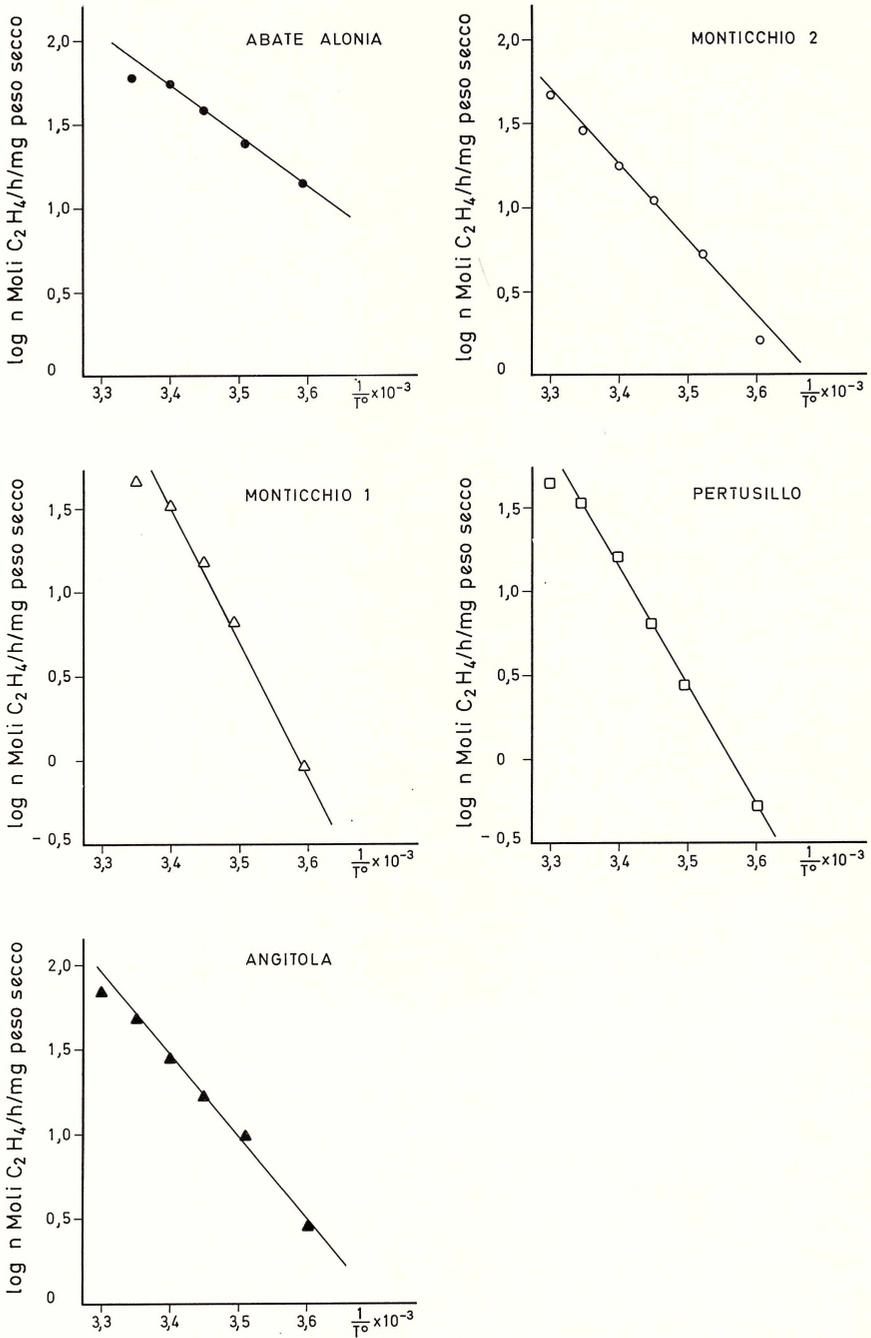


Fig. 3 — Diagrammi di Arrhenius dei dati presentati in figura 2.

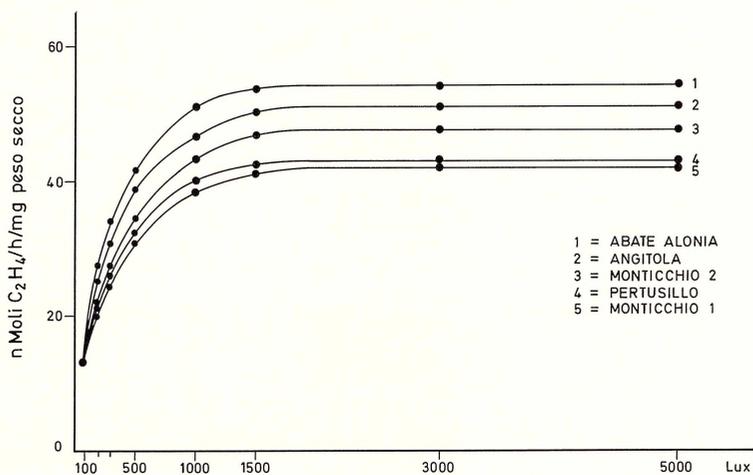


Fig. 4 — Effetto dell'intensità luminosa sulla riduzione di acetilene in cinque ceppi di *Anabaena* incubati alle rispettive temperature ottimali per l'attività nitrogenasica.

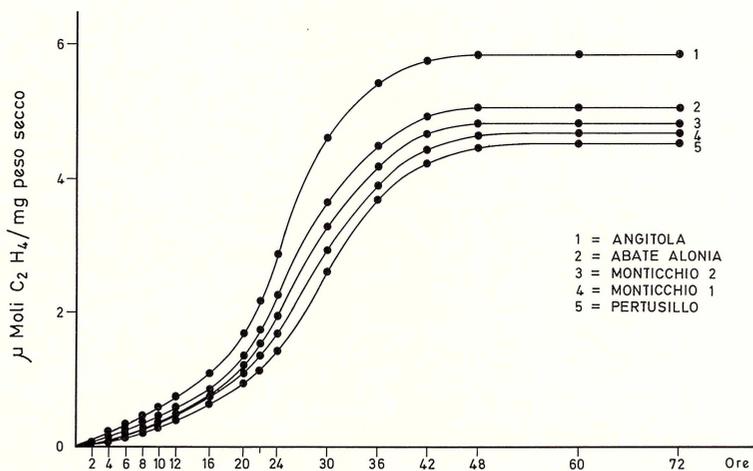


Fig. 5 — Effetto del tempo di incubazione sulla riduzione di acetilene in cinque ceppi di *Anabaena* incubati a 3000 lux ed alle rispettive temperature ottimali per l'attività nitrogenasica.

## CONCLUSIONI

L'attività nitrogenasica nei diversi ceppi di *Anabaena* da noi esaminati appare molto sensibile alla temperatura con una risposta di tipo esponenziale tra 5° e 25°C. I nostri dati inoltre sono coincidenti con quelli di Waughman (1977) che riporta un optimum di 30°C per un ceppo di *Anabaena* sp. da lui esaminato. Innalzamenti dell'attività nitrogenasica di questo tipo, nonché simili optimum di temperatura sono riportati anche per noduli di piante non leguminose (HANSLEY & CARPENTER, 1979; MORETTI *et al.*, 1982); per i noduli di leguminose, invece, non sempre vi è una risposta esponenziale alla temperatura (WAUGHMAN, 1977).

Lo studio del rapporto tra intensità luminosa ed attività nitrogenasica si è rivelato interessante in quanto alcuni dati al riguardo indicano un notevole abbassamento dell'attività intorno a 1500 lux (WAUGHMAN, 1977). I nostri risultati indicano, invece, che i ceppi di *Anabaena* esaminati mostrano una discreta attività nitrogenasica anche a basse intensità luminose (100 lux).

Le curve di attività nitrogenasica, ottenute per un periodo di incubazione di 72 ore, mostrano un andamento sigmoidale tra 16 e 36 ore. Questa « amplificazione » dell'attività nitrogenasica appare una caratteristica di *Anabaena*. In *Alnus* (MORETTI *et al.*, 1982) i noduli incubati per 24 ore mostrano attività lineare per le prime 6-8 ore, mentre declina lentamente nelle ore successive cessando del tutto a circa 12 ore; nella soia (HARDY *et al.*, 1968) i noduli incubati mostrano attività di tipo lineare per i primi 60 minuti, successivamente declina per cessare del tutto a 120 minuti.

Gli alti valori di fissazione dei nostri ceppi indicano una notevole potenzialità di azotofissazione di *Anabaena* nonché la possibilità di un suo impiego come fonte di azoto negli ecosistemi.

Dal punto di vista della potenzialità di applicazione, il ceppo di Abate Alonia, tra quelli da noi esaminati, si è rivelato il più interessante. Esso infatti si presenta come il più euritermico, manifestando una elevata attività nitrogenasica anche a basse temperature. Il basso valore del suo optimum di temperatura per la fissazione, inoltre, lo rendono particolarmente adatto per una utilizzazione nei climi temperati.

RIASSUNTO

Gli autori hanno isolato, da laghi dell'Italia meridionale, cinque ceppi di *Anabaena* di cui vengono riportate osservazioni sulla morfologia e caratteristiche colturali. Con scopi biologici ed applicativi è stata esaminata l'influenza della temperatura, dell'intensità luminosa e del tempo di incubazione sull'attività nitrogenasica dei cinque ceppi.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN M. M., 1973. *Methods for Cyanophyceae*. In: Handbook of phyco-logical methods. Culture methods and growth measurements, cap. 7, Cambridge University Press, Cambridge.
- BOURELLY P., 1970. *Les algues d'eau douce*. III. Ed. N. Boubée, Paris.
- BOZZINI A., P. DE LUCA, A. MORETTI, S. SABATO & G. SINISCALCO GIGLIANO, 1984. *Comparative study of six species of Azolla in relation as a green manure for rice*. Proceedings of the « Practical Applications of Azolla for rice Production », International Workshop, Mayaguez, Portorico, U.S.A. pp. 125-131.
- BOZZINI A., A. MORETTI, R. NAZZARO, G. SINISCALCO GIGLIANO & D. W. STEVENSON, 1983. *Cultivation in temperate climate of Sesbania rostrata Bremek. & Obern. (Fabaceae), a typical legume with nitrogen-fixing stem nodules*. *Delpinoia*, **25**: 39-52.
- CARR N. G., J. KOMAREK & B. A. WHITTON, 1973. *Notes on isolation and laboratory culture*. In: Carr N. G. & B. A. Whitton. The biology of blue green algae. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- GERLOFF G. C., C. P. FITZGERALD & F. S. SKOOG, 1950. *The isolation, purification and culture of blue-green algae*. *Am. J. Bot.*, **37**: 216-218.
- GORHAM P. R., J. R. MCLACHLAN & W. KIM, 1964. *Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos-aquae (Lyngb.) de breb. Verh. int. Verein. theor. angew. Limnol.*, **15**: 796-804.
- HARDY R. W. I., R. D. HOLSTEN, E. K. JACKSON & R. C. BURNS, 1968. *The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation*. *Plant Physiol.*, **43**: 1185-1207.
- HANSLEY D. L. & P. L. CARPENTER, 1979. *The effect of temperature on N<sub>2</sub>-fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by nodules of legume and Actinomycete-nodulated woody species*. *Bot. Gaz.*, **140** (suppl.): 58-64.
- HORNE A. J., 1977. *Nitrogen fixation in eutrophic lakes*. In: R. Mitchell (Ed.). *Water pollution microbiology*. Vol. 2: 1-30. John Wiley & Sons. New York.
- HUBER-PESTALOZZI G., 1938. *Das Phytoplankton des Susswassers*. I. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- HUGHES E. O., P. R. GORHAM & A. ZEHNDER, 1958. *Toxicity of a unialgal culture of Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **40**: 225-236.

- MORETTI A., S. SABATO & G. SINISCALCO GIGLIANO, 1982. *N<sub>2</sub> fixation by Alnus and Colletia*. Giorn. Bot. Ital., **116**: 135-142.
- WAUGHMAN G. J., 1977. *The effect of temperature on nitrogenase activity*. J. Exp. Bot., **28**: 949-960.
- WHITTON B. A. & N. G. CARR, 1982. *Cyanobacteria: current perspectives*. In: N. G. Carr & B. A. Whitton (Ed.). *The biology of cyanobacteria*. Vol. 19: 1-8. Blackwell Scientific Publications. Oxford.