

## La biodiversità naturale delle alghe e dei cianobatteri

Come tutti ormai sanno la biodiversità<sup>1</sup> degli organismi viventi è alla base dello sviluppo sostenibile da un determinato ecosistema. Senza la diversità genetica della popolazioni si osserverebbe un preoccupante impoverimento della conservazione della vita sulla Terra: oltre che risultato dell'evoluzione la biodiversità è infatti il serbatoio dell'evoluzione stessa degli organismi viventi e il supporto per i processi del loro adattamento all'ambiente.

Sino dalla metà degli anni '50, l'Istituto di Microbiologia Agraria dell'Università di Firenze (ora Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie) e il Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del CNR (ora Sezione di Firenze dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi) hanno indirizzato la loro attenzione ai microrganismi fotosintetici eucarioti e procarioti allo scopo di studiare la produzione di biomasse di alghe e cianobatteri per uso alimentare, mangimistico, acquacolturale e per la produzione di chemicals (proteine, polisaccaridi, acidi grassi, sostanze bioattive ecc.). Se però la realizzazione di una coltura massiva economicamente competitiva richiede lo sviluppo di appropriate tecniche di coltura (geometria dei sistemi colturali aperti o chiusi, concentrazione cellulare, saturazione luminosa ecc.) l'incremento della efficienza produttiva dei microrganismi utilizzati in coltura comporta sempre l'avvio di opportune selezioni su ciascun ceppo per accertarne la resistenza agli stress e/o la compatibilità con i vari sistemi colturali impiegati.

\* *Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino (Firenze)*

<sup>1</sup> Il termine *biodiversità*, che nasce dalla traduzione letterale del termine inglese *biodiversity*, in realtà nell'accezione italiana può assumere una connotazione negativa in quanto mentre in inglese *diverse* significa vario, molteplice, svariato, in italiano il termine *diverso* generalmente indica qualcosa che è al di fuori della norma, che differisce dallo standard di riferimento. Sarebbe perciò più corretto tradurlo con il termine di *biovarietà*.

	CIANOBATTERI
1957	<i>Nostoc; Anabaena</i>
1969	<i>Spirulina (Arthrospira)</i>
1983	<i>Cyanospira</i>
	MICROALGHE
1957	<i>Chlorella; Scenedesmus</i>
1980	<i>Tetraselmis</i>
1987	<i>Dunaniella</i>
1993	<i>Pavlova</i>
1994	<i>Nannochloropsis</i>
1995	<i>Isochrysis; Pheodactylum</i>
1997	<i>Monodus; Skeletonema</i>
2001	<i>Haematococcus</i>
2004	<i>Chlamydomonas</i>

Tab. 1 Anno d'inizio delle colture all'aperto dei principali microrganismi fotosintetici utilizzati a Firenze

In questo lungo lavoro di selezione l'interesse della scuola fiorentina è sempre stato rivolto all'utilizzo di ceppi algali e cianobatterici non di collezione. Per gli studi sulla coltura massiva con microrganismi fotosintetici, vi è stata perciò sempre la necessità di reperire i nuovi ceppi algali o cianobatterici che sarebbero poi stati utili per gli usi applicativi che di volta in volta destavano il nostro interesse.

Nel corso di questi 50 anni numerosissimi ceppi sono stati così isolati dalle più svariate località e molti di essi, dopo un primo *screening* in laboratorio in cui veniva studiata la fisiologia della crescita e la composizione della biomasse prodotte, furono poi impiegati nelle prove di coltura massiva all'aperto.

Attualmente, presso la Collezione di microalghe e cianobatteri dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del CNR, sono conservati più di 180 ceppi di microalghe e circa 800 ceppi di cianobatteri isolati da suoli, simbiosi con piante, acque dolci, marine e ipersaline di differenti regioni (temperate, tropicali e polari) e da monumenti lapidei.

Nella tabella 1 sono stati riportati i principali generi di microalghe e cianobatteri di cui, durante tutto questo cinquantennio, numerose specie o stipiti diversi per ciascuna specie sono state saggiate per la coltura massiva all'aperto.

A causa delle esigenze connesse con la crescita all'aperto in condizioni naturali, è sempre stato rivolto uno specifico interesse nei confronti della capacità di crescita entro un ampio range di temperature. Questo ha comportato, di conseguenza, la necessità di reperire dai più svariati habitats i campioni di acqua da cui isolare alghe e cianobatteri. In quest'ottica una particolare

attenzione è stata indirizzata allo studio dei laghi alcalini (natronati) del Ciad e del Kenya in Africa e del Messico in America centrale. Malgrado la natura estrema di questi ambienti, i laghi ricchi di sali complessi di carbonati come il natron  $[\text{Na}_2(\text{CO}_3) \cdot 10(\text{H}_2\text{O})]$  o il trona  $[\text{Na}_3(\text{HCO}_3)(\text{CO}_3) \cdot 2(\text{H}_2\text{O})]$  sono caratterizzati da una produttività in biomassa eccezionalmente ricca con tassi di carbonio prodotto spesso superiori ai  $10 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ . Grazie alle elevate temperature, all'alta intensità luminosa, alla disponibilità di fosfato e alla quasi illimitata disponibilità di  $\text{CO}_2$ , questi laghi costituiscono gli ambienti più produttivi della Terra. Sono ormai quasi 40 anni che tali particolari habitats sono studiati a Firenze e molti campionamenti sono stati raccolti dai laghi alcalini del Ciad (Rombou, Mombolo, Kailala e Kossorom), del Kenya (Nakuru, Elmenteita e Magadi) e del Messico (Texoco).

Nell'ambito di questa breve rassegna sulla biodiversità naturale delle alghe e dei cianobatteri a titolo di esempio, verranno illustrate le tappe salienti che hanno portato all'isolamento di due cianobatteri che hanno svolto un ruolo importante nella ricerca sulla coltura delle alghe a Firenze: *Spirulina* (*Arthrospira*) e *Cyanospira*.

Le ricerche su questi due cianobatteri che presentavano caratteri morfologici e fisiologici differenti da quelli delle specie europee generalmente più studiate e conosciute, ha favorito lo sviluppo di tutta una serie di studi di carattere tassonomico per il loro inquadramento sistematico sia a livello di genere che di specie. I cianobatteri sono organismi molto vecchi e nel corso della loro storia evolutiva hanno avuto la possibilità di essere trasportati in tutto il mondo. Da quando sono comparsi sulla Terra tre miliardi e mezzo di anni fa, hanno così avuto una grande possibilità di adattamento ecologico e di differenziazione genetica e conseguentemente, quando si studiano i cianobatteri tropicali, la maggiore biodiversità delle loro popolazioni rispetto a quelle delle zone moderate rende molto difficile se non impossibile descrivere ed identificare una specie con le sole chiavi tassonomiche redatte da Geitler per le sole specie europee (Geitler, 1932).

#### SPIRULINA (ARTHROSPIRA)

La sistematica di *Spirulina* o *Arthrospira* come più propriamente vada chiamata oggi la specie utilizzata per la coltura massiva all'aperto, ha avuto molte e differenti interpretazioni da quando nel 1844 Wittrock e Nordstedt osservarono vicino Montevideo (Uruguay) un cianobatterio spiralato che descrissero come *Spirulina jenneri* f. *platensis*. Trascorsi pochi anni, nel 1852 Stizenberger

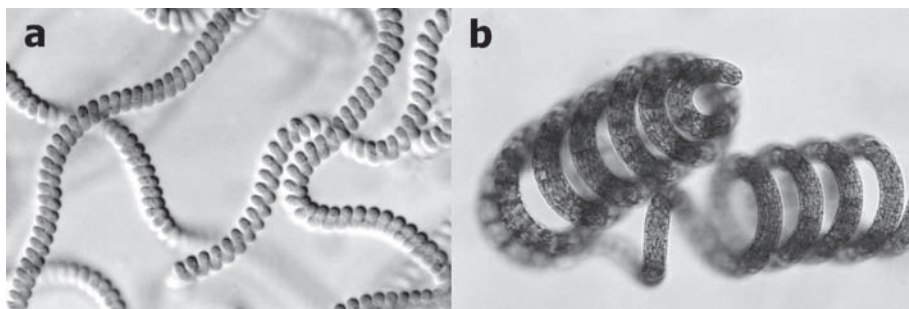


Fig. 1 Genere-forma *Spirulina* con elica generalmente chiusa e mobile per rotazione, diametro di 2-4  $\mu\text{m}$  e setti invisibili (a); genere-forma *Arthrospira* con elica aperta, setti visibili, gas-vacuoli generalmente presenti e diametro di 6-12  $\mu\text{m}$ . (b) (Ingrandimenti:  $\times 700$  fig. 1a;  $\times 350$  fig. 1b)

osservando la presenza di setti lungo il filamento spiralato propose la creazione del nuovo genere *Arthrospira* per distinguerlo da *Spirulina* che era invece considerato unicellulare. Questa distinzione in base alla presenza o meno di setti nella spirale fu mantenuta in seguito sia da Gomont (1893) con le due sezioni dei *trichomata unicellularia* e *trichomata pluricellularia* rispettivamente per *Spirulina* e *Arthrospira*, sia da Forti (1907), sempre con l'attribuzione a due generi diversi dei *filamenta unicellularia* (*Spirulina*) e dei *filamenta pluricellularia* (*Arthrospira*). Nel 1932 la separazione tra i due generi fu però abbandonata da Geitler. Questo insigne tassonomo, a cui è dovuta la riconoscenza di tutti quelli che studiano i cianobatteri, pur suddividendo il taxa nelle due sezioni sub-generiche di *Arthrospira* ed *Euspirulina*, abbandonò la denominazione di *Arthrospira* e riunificò in *Spirulina* Turpin 1829 i due generi che fino a quel momento erano rimasti separati.

Solo in tempi relativamente recenti si è di nuovo tornati alla vecchia denominazione di *Arthrospira* per le specie più grandi e soprattutto con i setti ben visibili al microscopio (Komárek e Lund, 1990; Desikachary e Jeeji Bai, 1996). Negli ultimi dieci anni a questo riguardo sono stati dati importanti contributi anche dalla scuola fiorentina sia per quanto riguarda l'uso corretto della designazione di *Spirulina* (Tomaselli e al., 1996), sia per quanto riguarda un approfondito esame della sistematica e della ecofisiologia di *Arthrospira* e *Spirulina* (Tomaselli, 1997; Vonshak e Tomaselli, 2000). Ultimamente, nel 2001, con l'uscita sul "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" della nuova classificazione dei cianobatteri sono stati inseriti nel genere-forma *Spirulina* le specie con elica generalmente chiusa permanentemente mobili per rotazione, con setti sottili invisibili al microscopio ottico e con diametro di 2-4  $\mu\text{m}$  (fig. 1a) e nel genere-forma *Arthrospira* le specie con elica general-

mente aperta, setti visibili, diametro di 6-12  $\mu\text{m}$  e gas-vacuoli generalmente presenti (fig. 1b).

La distribuzione nel mondo di *Arthrospira* è molto ampia e, ad eccezione dell'Oceania per cui al momento non esistono evidenze positive, tutti i continenti presentano ambienti acquatici più o meno estesi in cui sono state osservate e descritte specie appartenenti a questo genere. Subito dopo le prime esperienze di coltura massiva di *Spirulina* (*Arthrospira*) a Firenze (Tomaselli e al., 1969) sono così iniziati numerosi *screening* per l'isolamento di nuovi ceppi concentrando le ricerche sui tre paesi che dalla letteratura presentavano le maggiori possibilità di reperimento: il Ciad, il Kenia e il Messico. Questa lunga ricerca, che ha impegnato il nostro gruppo nel corso di svariati anni e che ha ottenuto i migliori risultati soprattutto dai campionamenti africani, ha consentito di isolare qualche centinaio di ceppi di *Arthrospira* e, dopo un prima indagine in laboratorio sulla fisiologia di crescita di ciascun isolato, ha dato luogo per qualche decina di essi alle prove sperimentali all'aperto in coltura massiva. Il Lago Ciad, uno degli ambienti che abbiamo più studiato, è situato lungo il confine meridionale del Sahara ed è attraversato dai confini di quattro stati: il Niger, il Ciad, il Camerun e la Nigeria. Caratteristica di questo lago, che ha attualmente una superficie di circa 1.600 Km<sup>2</sup> e che non è alcalino, è la presenza lungo la zona nord orientale di una numerosa serie di piccoli bacini che generalmente non superano i cinquecento metri di diametro e che invece presentano una forte alcalinità (pH 8,7-10,5). Questi piccoli laghi, generalmente alimentati dalla falda acquifera, sono poco profondi (< 3m) e soggetti a notevoli fenomeni di evaporazione. Da quattro di essi, il Rombou, il Mombolo, il Kailala e il Kossorom, sono stati isolati diversi ceppi di *Arthrospira* (figg. 2a, 2b, 2c e 2d). Uno di essi, il ceppo M2 che ha perduto ormai del tutto la forma elicoidale ed è stato isolato dal lago Mombolo ormai da quasi 35 anni, si è dimostrato il più produttivo in coltura massiva grazie alle spiccate caratteristiche di resistenza alle alte temperature durante il periodo estivo (fino a 44° C). Più recentemente, negli anni 1996 e 1997, sono stati isolati una novantina di ceppi di *Arthrospira fusiformis* (Sili e al., 1999; Sili, 2005) caratterizzati da una estrema variabilità della forma della spirale e, alcuni di essi come il Ka9 e il Ka15, hanno mostrato produttività analoghe al ceppo M2.

Fortemente alcalini ma di dimensioni notevolmente superiori ai laghi alcalini intorno al lago Ciad, sono il nutrito numero di laghi situati lungo la Rift Valley che attraversa il Kenia, la Tanzania, l'Etiopia e l'Egitto (Tomaselli e al., 1978; Margheri e al., 1983). Da uno di essi, il Lago Nakuru, in epoche successive sono stati isolati alcuni ceppi con buoni tassi di produttività e di-

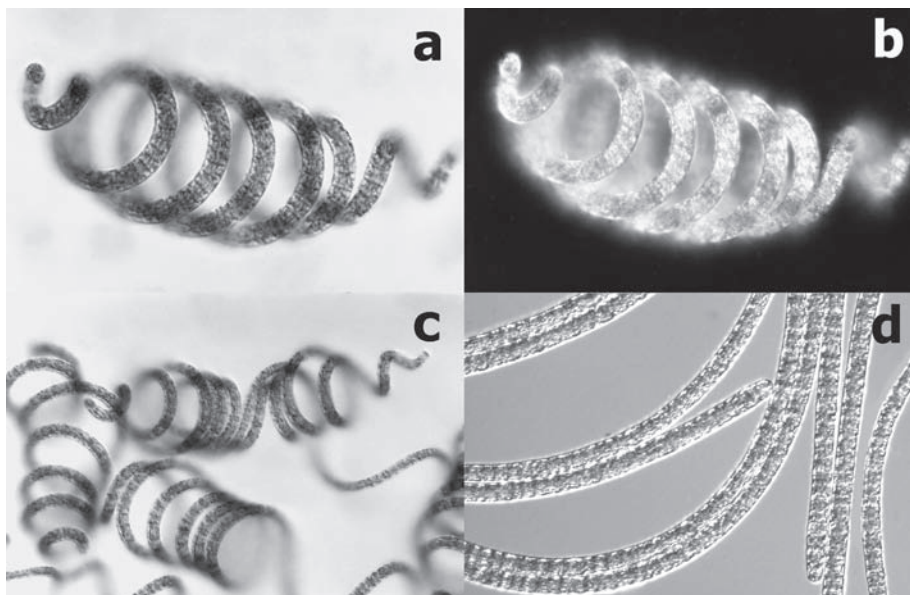


Fig. 2 *Arthrospira* Ka9 isolata dal Lago Kailala (a); *idem* fotografata in campo oscuro per evidenziare la cospicua presenza di gas-vacuoli (b); *Arthrospira* Ks7 isolata dal Lago Kossorom (c); *Arthrospira* M2 isolata dal Lago Mombolo e ormai priva di spirality dopo 35 anni di coltura in laboratorio e all'aperto (d). (Ingrandimenti: x350 fig. 2a, 2b e 2d; x150 fig. 2c)

screscita resistenza a condizioni di crescita a temperature elevate (Balloni e al., 1980).

Per quanto riguarda invece il continente americano un interessante sito di prelievo è risultato l'evaporatore solare (Caracol) che sorge a nord est di Città del Messico. Questa città è stata edificata sulle rovine dell'antica Tenochtitlán che gli aztechi avevano costruito al centro del Lago Texoco e dalle cui acque, le popolazioni indigene al tempo della conquista spagnola del Messico, risulta che raccogliessero per scopi alimentari le spesse fioriture di *Arthrospira* che galleggiavano copiose sulla superficie dell'acqua. Come risulta dalle antiche illustrazioni del tempo, il sistema di raccolta con recipienti di paglia intrecciata presenta molte analogie con quello utilizzato, anche attualmente, dalle popolazioni indigene che raccolgono questo cianobatterio dai laghi alcalini del Ciad. L'utilizzazione a scopo alimentare di *Arthrospira*, per primo segnalata da Dangeard (1940) e Leonard (1966), è come abbiamo recentemente potuto documentare da due nostre spedizioni in quei luoghi (Abdulqader e al., 2000) tuttora ampiamente praticata dalle popolazioni locali. La popolazione Kanembu infatti raccoglie significative biomasse di *Arthrospira* dal

lago Kossorom (circa 40t annue) con una minima produttività in dicembre e gennaio e la massima tra giugno e settembre durante la stagione delle piogge. La raccolta di questo cianobatterio è esclusiva della popolazione femminile dei Kanembu: agli uomini è fatto esplicito divieto di entrare nelle acque in quanto, per una vecchia tradizione del villaggio, essi renderebbero sterile il lago e causerebbero un arresto della produzione di *Arthrospira*. La raccolta, coordinata da un'anziana del villaggio secondo un preciso e ormai consolidato protocollo, inizia alle 7.00 del mattino ed è completata in circa due ore. Le donne raccolgono la biomassa galleggiante sulla superficie dell'acqua specialmente lungo i bordi del lago e la versano dentro cesti di paglia intrecciata che fungono da filtro primario. Per la filtrazione finale e l'essiccamento di *Arthrospira*, le donne formano sulla sabbia una piccola buca circolare dove la sospensione di *Arthrospira* viene versata e spianata con il palmo della mano. Con le temperature e la forte insolazione del luogo entro pochi minuti, quasi tutta l'acqua evapora e la biomassa, precedentemente suddivisa in riquadri di 8 -10 cm e 1-1,5 cm di spessore (*dihé*) quando è ancora semi-umida viene portata al mercato per la vendita. Il *dihé* è utilizzato principalmente per preparare una salsa servita con cereali.

#### CYANOSPIRA

Sempre per la ricerca di nuovi ceppi di *Arthrospira* da utilizzare per la coltura massiva all'aperto, durante il 1981 e il 1982 furono raccolti alcuni campioni di acqua dal Lago Magadi. Questo lago che è situato nella Rift Valley orientale, tra il Kenya e la Tanzania, costituisce insieme agli altri numerosi laghi alcalini sodici della zona (Bogoria, Nakuru, Elmenteita, Natron, Elyasi e Manyara) una tipica nicchia ecologica caratterizzata da numerose sorgenti termali alcaline di origine vulcanica e da un pH che facilmente può raggiungere valori elevatissimi (10,5-11,5). Il Lago Magadi, che si estende per oltre 100 Km<sup>2</sup>, è uno tra i più grandi di questi laghi alcalini e, ad eccezione del periodo delle piogge, nella sua parte centrale che spesso rimane all'asciutto, presenta depositi di trona profondi in alcuni punti anche decine di metri. Da sempre il lago Magadi ospita popolazioni di fenicotteri rosa più o meno numerose in funzione della disponibilità di biomassa algale (essenzialmente *Arthrospira*) di cui si nutrono. Nei campioni prelevati in due riprese successive furono osservati diverse specie di cianobatteri (tab. 2), molti di essi furono isolati in coltura pura e, per alcuni (*Spirulina laxissima* e *Arthrospira jenneri*), furono allestite prove di crescita in colture all'aperto (Sili e al., 1983). Per due



SPECIE	MAGGIO 1981	LUGLIO 1982
<i>Arthrospira fusiformis</i>	+	+
<i>Arthrospira jenneri</i>	+	
<i>Spirulina laxissima</i>	+	+
<i>Spirulina subsalsa</i>	+	+
<i>Spirulina major</i>	+	
<i>Cyanospira capsulata</i>	+	
<i>Cyanospira rippkae</i>		+
<i>Lyngbya limnetica</i>	+	
<i>Oscillatoria chlorina</i>	+	
<i>Oscillatoria limnetica</i>		+
<i>Oscillatoria formosa</i>	+	
<i>Oscillatoria limosa</i>	+	+
<i>Pseudanabaena catenata</i>	+	+
<i>Nostoc punctiforme</i>	+	
<i>Synechococcus elongatus</i>	+	+
<i>Synechocystis aquatilis</i>	+	
<i>Chroococcus limneticus</i>	+	+
<i>Merismopedia tenuissima</i>	+	+

Tab. 2 *Cianobatteri osservati nei campioni dal Lago Magadi prelevati negli anni 1981 e 1982*

dei cianobatteri osservati e successivamente isolati fu però da subito evidente la difficoltà dell'utilizzo delle comuni chiavi tassonomiche di Geitler (1932) o Desikashary (1959) per la loro identificazione. Il primo cianobatterio, isolato dal Lago Magadi nel 1981, si presentava con un tricoma di forma elicoidale e cellule vegetative larghe 6-6,5  $\mu\text{m}$  ricche di gas-vacuoli (aerotopi) e con eterocisti larghe 7-8  $\mu\text{m}$  (fig. 3a). Dopo colorazione negativa con inchiostro di china il tricoma mostrava una spessa capsula con un diametro totale di

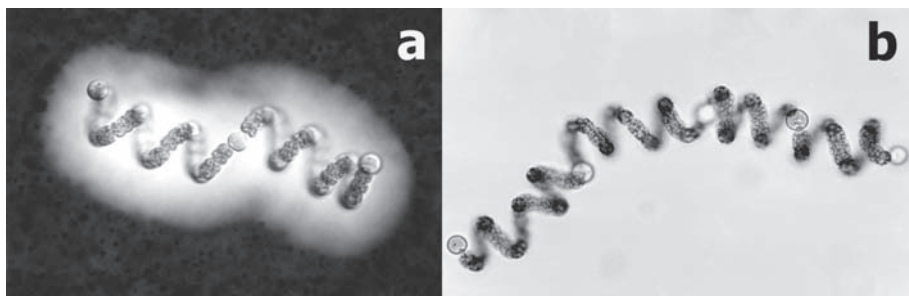


Fig. 3 *Cyanospira capsulata* colorata negativamente con inchiostro di china per evidenziare la spessa capsula mucillaginosa (a); *Cyanospira rippkae* (b). (Ingrandimenti: x350)





Fig. 4 *Maturazione degli acineti durante lo sviluppo apoeterocitico in Cyanospira capsulata. La differenziazione dalle cellule vegetative inizia a partire dalla porzione mediana tra due eterocisti (a) e prosegue interessando progressivamente anche le altre cellule vegetative (b). Non di rado tutte le cellule vegetative si trasformano in acineti (c). (Ingrandimenti: x300)*

60-70  $\mu\text{m}$ . Il secondo cianobatterio (fig. 3b), isolato nel successivo campionamento del 1982, era ugualmente spiralato ma senza capsula e leggermente più piccolo (cellule vegetative larghe 5,5-6  $\mu\text{m}$  ed eterocisti larghe 6-7  $\mu\text{m}$ ). Caratteristica comune ad ambedue gli isolati era la cospicua produzione di spore (acineti) disposte in catena secondo un tipico processo di trasformazione delle cellule vegetative e una ben definita posizione rispetto alle eterocisti che, di lì a pochi anni Komárek ed Anagnostidis (1989) avrebbero descritto come sviluppo apoeterocitico (figg. 4a e 4b). Nello sviluppo apoeterocitico, gli acineti cominciano a differenziarsi a partire da quelli che si trovano in posizione centrale ed equidistante tra due eterocisti e, durante la progressiva maturazione, si osserva la formazione di catene di acineti marroni poco più grandi delle cellule vegetative (8-9- $\mu\text{m}$ ). Queste catene di acineti generalmente costituite da 6-9 cellule tendono a distaccarsi dal filamento e non di rado, anche tutte le cellule vegetative del tricoma possono essere interessate dal processo di acinetizzazione (fig. 4c).

A quell'epoca erano trascorsi solo pochi anni da quando sotto il forte impulso di Stanier (1977) era stata suggerita la creazione di una nuova classificazione dei cianobatteri basata sulle proprietà strutturali e fisiologiche dei ceppi isolati in cultura pura (Rippka et al., 1979). Per portare un nostro contributo a questo approccio "batteriologico" della sistematica dei cianobatteri, proponemmo di includere i due cianobatteri, con il nome di *Cyanospira capsulata* Mag I 501 e *Cyanospira rippkae* Mag II 702, nella Sezione IV del nuovo sistema di classificazione (Florenzano et al., 1985). La tipica differenziazione degli acineti in catene, sempre lontani dalle eterocisti e la costante mancanza di doppie eterocisti nei tricomi furono ritenuti dei caratteri validi per separare il nuovo genere *Cyanospira* da noi proposto rispettivamente da *Anabaena* (che presenta uno o due acineti generalmente molto più grandi delle cellule vegetative e sempre vicino alle eterocisti) e da *Anabaenopsis* (che



Fig. 5 *Differenti aspetti di Cyanospira capsulata durante la crescita di colture in batch all'inizio (a), dopo 10 giorni (b) e dopo 20 giorni (c). Con il rilascio del polisaccaride nella coltura e il conseguente aumento della viscosità si osserva, dopo colorazione negativa con inchiostro di china, la diversa diffusione delle particelle del colorante nel mezzo nutritivo. (Ingrandimenti: x300)*

presenta una caratteristica divisione asimmetrica delle due cellule vegetative da cui si differenzia la coppia di eterocisti che è tipica di questo genere). Dopo una prima fase in cui alcuni rilievi critici furono fatti alla nostra proposta e, per la verità, a volte anche molto duri e spiacevoli (Rippka, 1988; Komárek e Anagnostidis, 1989), nel 2001 il genere *Cyanospira* è stato incluso nella IV Sottosezione (“Ordine”) dei Cianobatteri nell’ultima edizione della sistematica batterica del Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology “come uno dei rari generi la cui descrizione è stata fatta seguendo il regolamento del Codice Batteriologico di Nomenclatura” (Rippka e al., 2001). Più recentemente, il valore sistematico di *Cyanospira* è stato riconosciuto anche dai tassonomi di scuola più specificatamente “botanica” e, nella elaborazione a livello di genere del nuovo stato tassonomico dei cianobatteri fatta nel 2004, è stata inserita nella famiglia delle Nostocaceae, ordine Nostocales, subclasse Nostocophycideae (Hoffmann e al., 2005).

Da quando sono iniziati gli studi sui due ceppi di *Cyanospira* circa 40 lavori riguardanti questo nuovo genere sono stati pubblicati e molti di essi hanno riguardato la capsula di natura polisaccaridica che avvolge *C. capsulata* e la sintesi del polisaccaride esocellulare prodotto (EPS), la cinetica di rilascio del polimero nel mezzo di coltura e le caratteristiche chimiche, reologiche e macromolecolari dell’EPS (Vincenzini e al., 1990a; 1990b; 1993; De Philippis e al., 1991; 1996). *Cyanospira capsulata* produce infatti cospicue quantità di esopolisaccaride quando è fatta crescere nelle colture in *batch*: all’inizio della fase di crescita i tricomi mostrano una spiralatura regolare e sono avvolti da una spessa capsula mucillaginosa (fig. 5a); dopo circa 10 giorni, nelle vecchie culture il materiale mucillaginoso solubile viene rilasciato nel mezzo nutritivo e la coltura diventa molto viscosa (fig. 5b); dopo circa 20 giorni, alla fine del ciclo di produzione, il materiale mucillaginoso disciolto nel mezzo risulta

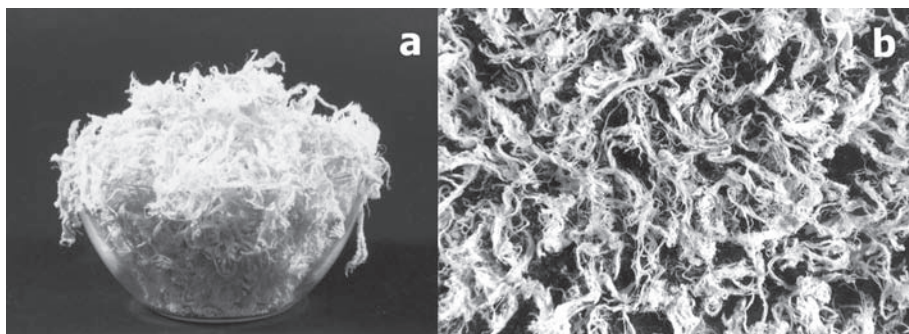


Fig. 6 Aspetto del polisaccaride esocellulare prodotto da *Cyanospira capsulata* dopo la precipitazione con alcol propilico (a); particolare delle fibre setose (b)

molto evidente e la viscosità raggiunge i massimi valori (fig. 5c). Dalla centrifugazione della sospensione cellulare e dalla successiva precipitazione in alcol propilico del surnatante limpido ottenuto è possibile raccogliere il polisaccaride esocellulare crudo (fig. 6a e 6b).

Come abbiamo visto in precedenza, *Cyanospira* è caratterizzata anche dalla produzione di una grossa quantità di acineti. Questo ha consentito di ottenere e conservare una volta essiccati, numerosi campioni di queste spore da quando nel 1983 iniziarono le prime colture in laboratorio e all'aperto (Sili e al., 1984). Sugli svariati campioni di acineti essiccati di cui oggi disponiamo (alcuni di essi hanno più di 24 anni!) sono stati effettuati diversi studi di germinabilità per verificare la loro vitalità nel corso del tempo. È generalmente noto che gli acineti giocano un ruolo importante come strutture perennanti per sopravvivere tra una stagione e l'altra nei bacini lacustri ma in *Cyanospira* fin dalle prime osservazioni furono subito evidenti delle spiccate capacità di rigerminare con alti tassi di germinabilità (anche il 93%) una volta che acineti secchi vecchi anche più di sette anni venivano reidratati con acqua o mezzo di coltura, e posti alla luce con un'illuminazione continua (Sili e al., 1994). In queste condizioni, la germinazione degli acineti di *Cyanospira capsulata* durante le prime 24 ore risultava fortemente sincrona e, senza bisogno di nessuna induzione artificiale, consentiva di osservare tutte le varie fasi di differenziazione (prima divisione cellulare, prima formazione di una proeterociste, prima formazione di una eterociste ecc.) ad un unico e simultaneo stadio in tutti gli individui presenti nella coltura (fig. 7). La prima trasformazione evidente avveniva subito dopo 4-5 ore con un aumento del turgore cellulare, una leggera diminuzione dello spessore della parete dell'acineti e il

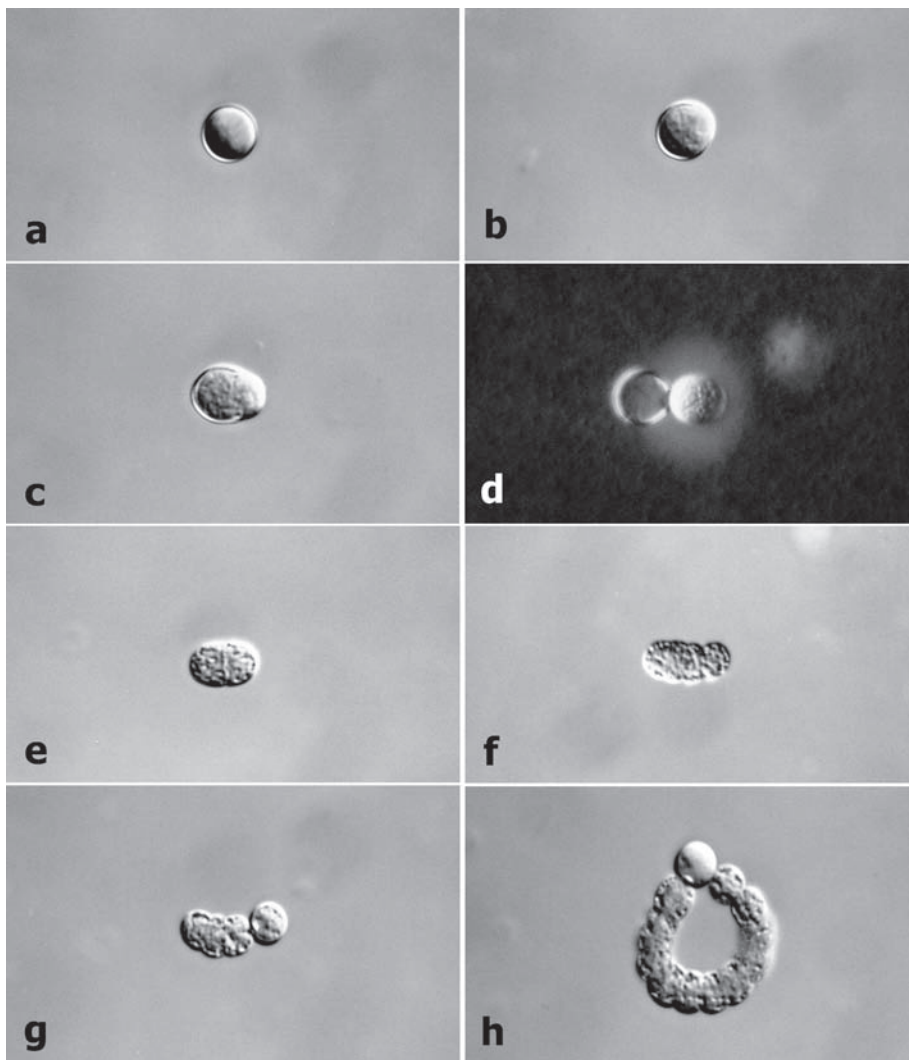


Fig. 7 *Principali modificazioni durante la germinazione degli acineti di Cyanospira capsulata su mezzo nutritivo privo di fonti azotate: a) acinete marrone; b) acinete verde dopo 4-5 ore; c) rottura della parete dell'acinete alla 9a-10a ora; d) deiscenza del germinello con la capsula (colorazione negativa con inchiostro di china); e) prima divisione alla 12a ora; f) prima proeterociste tra la 14a-16a ora; g) prima eterociste alla 18a-21a ora; h) inizio di spiralizzazione di un giovane trichoma (dopo 50-55 ore). (Ingrandimenti:  $\times 800$ )*

viraggio del colore da marrone a verde. Dopo circa 8-9 ore, in seguito ad un ulteriore aumento del turgore cellulare, si osservava la rottura della parete dell'acinete e una cellula indivisa già completamente circondata dalla

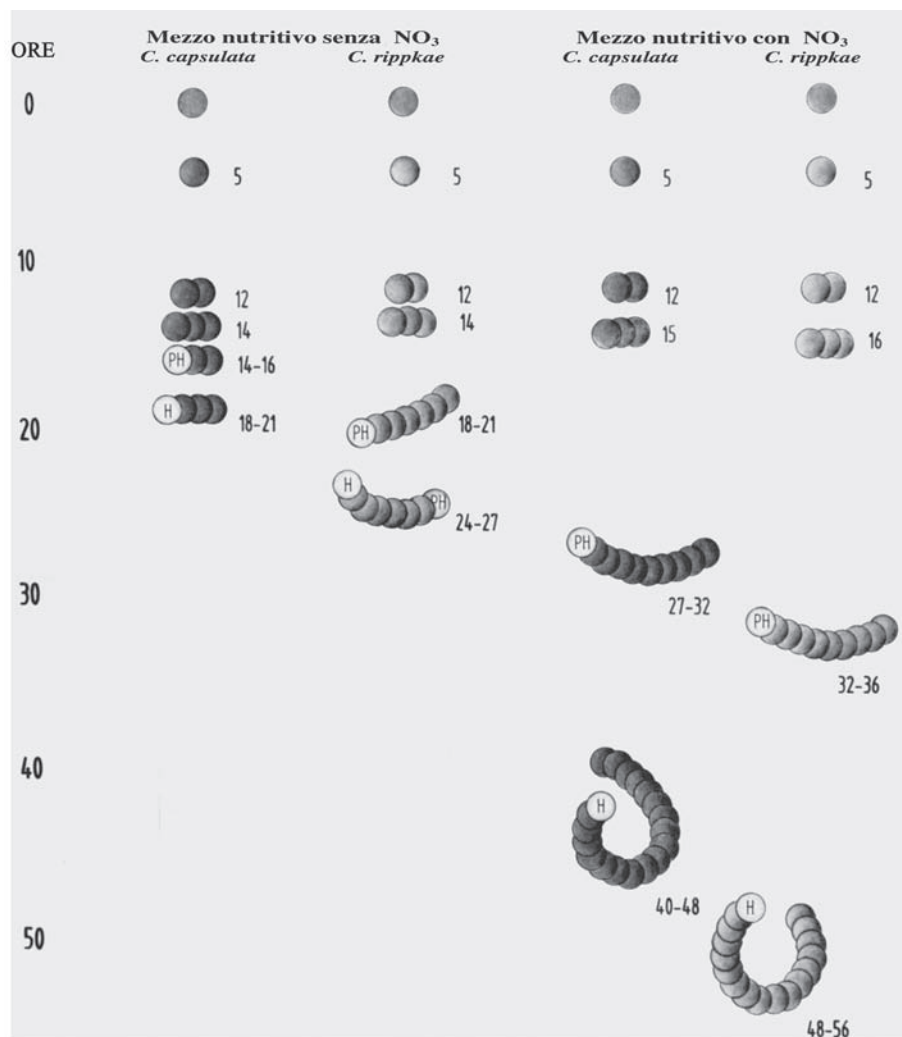


Fig. 8 Rappresentazione schematica della cinetica di germinazione in *Cyanospira capsulata* e *C. rippkai* coltivate su mezzo nutritivo senza e con aggiunta di nitrato

capsula, emergeva dalla parete dell'acinete. Il germinello così neoformato, dopo appena 12 ore dal momento della reidratazione, aveva completato la sua prima divisione cellulare e in rapida successione nell'arco delle 24-25 ore in cui si osservava la fase di crescita sincrona portava a termine tutte le principali fasi di trasformazione: alla 13<sup>a</sup>-14<sup>a</sup> ora la terza divisione cellulare; entro la 16<sup>a</sup> ora la differenziazione della prima proeterocisti; tra

la 18<sup>a</sup> e la 21<sup>a</sup> ora la differenziazione della prima eterociste e con essa la possibilità di fissare l'azoto atmosferico.

La tempistica di tutte le modificazioni morfologiche degli acineti, come è mostrato dalla figura 8, fu diversa sia in funzione della specie sia delle condizioni nutritive utilizzati nelle prove. In *C. rippkae* infatti, dopo una prima fase identica a *C. capsulata* fino alla 14<sup>a</sup> ora, fu osservato un ritardo di alcune ore per la differenziazione nel germinello della prima proeterociste e della prima eterociste (Sili e Vincenzini, 1994). Nelle prove con mezzo nutritivo contenente una fonte azotata si osservò in ambedue le specie, anche se più marcatamente con *C. rippkae*, un notevole ritardo nella formazione delle eterocisti (dopo 48-56 ore).

Dopo tutti questi anni la germinabilità degli acineti di *Cyanospira* è ancora molto pronunciata e da campioni di acineti essiccati vecchi più di 22 anni fatti rigerminare nella primavera del 2005, è stato possibile osservare un'alta percentuale di germinabilità.

Similmente alla mitologica araba fenice che aveva il dono di morire e risorgere dalle sue ceneri, anche *Cyanospira*, come novella fenice microbiologica, sembra rinascere dalle "ceneri" dei suoi acineti marroni ed essiccati a dimostrazione di una strategia di sopravvivenza che ha finora consentito il perpetuarsi di questo straordinario cianobatterio in quegli habitats così estremi e spesso soggetti a prolungati periodi di siccità.

*che la fenice more e poi rinasce,  
quando al cinquecentesimo appressa  
erba né biada in sua vita non pasce,  
ma sol d'incenso lacrima e d'amomo,  
e nardo e mirra son l'ultime fasce.  
(Inferno, XXIV, 107-111)*

## CONCLUSIONI

Dai due esempi di *Arthrospira* e *Cyanospira* sulla biodiversità dei cianobatteri utilizzati per la coltura massiva a Firenze di cui abbiamo fatto un breve cenno, appare evidente il respiro internazionale delle ricerche che hanno sempre coinvolto la scuola fiorentina in tutto questo ultimo cinquantennio. L'originalità e il valore degli studi effettuati, che a volte ha provocato dibattiti scientifici anche piuttosto accesi ma che ci ha visto alla fine comunque portatori di idee e scoperte in seguito riconosciute da tutta la comunità scientifica, ci da motivo di soddisfazione e stimolo a proseguire su questa strada.



## RIASSUNTO

A titolo di esempio della biodiversità naturale delle alghe e dei cianobatteri, vengono descritte le tappe fondamentali che hanno caratterizzato l'isolamento, la tassonomia, la morfologia e alcune loro specifiche caratteristiche fisiologiche in due, *Arthrospira* e *Cyanospira*, tra i tanti cianobatteri e alghe utilizzati per la coltura massiva all'aperto in questi ultimi cinquanta anni a Firenze.

## ABSTRACT

By way of example of the natural biodiversity of algae and cyanobacteria, the fundamental steps concerning isolation, taxonomy, morphology and determination of some specific physiological characteristics in two, *Arthrospira* and *Cyanospira*, among the several cyanobacteria and algae used in outdoor mass cultures during the last fifty years in Florence are described.

## BIBLIOGRAFIA

- A.A. (2001): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition*, Springer-Verlag, Boone D. R. & Castenholz R. W. (eds.), Volume One, pp. 721.
- ABDULQADER G., BARSANTI L., TREDICI M. R. (2000): *Harvest of Arthrospira platensis from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu*, «Journal of Applied Phycology», 12, pp. 493-498.
- BALLONI W., TOMASELLI L., GIOVANNETTI L., MARGHERI M. C. (1980): *Biologia fondamentale del genere Spirulina*, Atti Convegno "Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia", pp. 49-85.
- DANGEARD P. (1940): *Sur une algue bleue alimentaire pour l'homme: Arthrospira platensis (Nordest.) Gomont*, Actes Soc. Linn. Bordeaux, 91, pp. 39-41.
- DE PHILIPPIS R., SILI C., TASSINATO G., VINCENZINI M. e MATERASSI R. (1991): *Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by Cyanospira capsulata*, «Bioresource Technology», 38, pp. 101-104.
- DE PHILIPPIS R., SILI C. e VINCENZINI M. (1996): *Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux*, «Journal of Applied Phycology», 8, pp. 275-281.
- DESIKASHARY T. V. (1959): *Cyanophyta*, Indian Council for Agricultural Research. Monographs on Algae, New Delhi, pp. 686.
- DESIKASHARY T.V. e JEEJI BAI N. (1996): *Taxonomic studies in Spirulina II. The identification of Arthrospira ("Spirulina") strains and natural samples of different geographical origins*, Arch. Hidrobiol., Suppl. 116, «Algological Studies», 83, pp. 163-168.
- FORTI A. (1907): *Myxophyceae*, in De Toni (ed.): *Silloge Algarum Omnium*, Padova, pp. 761.
- GEITLER L. (1932): *Cyanophyceae*, in Rabenhorst's Kryptogamen-Flora. Cyanophyceae von Europa, pp. 1196, Akademische Verlagsges., Leipzig.
- GOMONT M. (1892): *Monographie des Oscillariées*, «Ann. Sci. Nat. Bot.», Sér 7.15, pp. 263-368; 16, pp. 91-264.



- FLORENZANO G., SILI C., VINCENZINI M., PELOSI E. (1985): *Cyanospira rippkae* and *Cyanospira capsulata* (gen. nov. and spp. nov.): new filamentous heterocystous cyanobacteria from Magadi lake (Kenya), «Archiv. of Microbiol.», 140, pp. 301-306.
- HOFFMAN L., KOMÁREK J., KAŠTOVSKÝ J. (2005): *System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) –state 2004*, «Algological Studies», 117, pp. 95-115.
- KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. (1989): *Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 – Nostocales*, Arch. Hydrobiol., Suppl. 82,3, «Algological Studies», 56, pp. 247-345.
- KOMÁREK J. e LUND J. W. G. (1990): *What is "Spirulina platensis" in fact?*, Arch. Hydrobiol., Suppl. 85, «Algological Studies», 58, pp. 1-6.
- LEONARD J. (1966): *The 1964-65 Belgian trans-saharan expedition*, «Nature», London, 209, pp. 126-128.
- MARGHERI M.C., TOMASELLI L. e SILI C. (1983): *Ecologia dei microrganismi fotosintetici in alcuni laghi della Rift Valley Orientale (Kenia)*, Atti XX Congr. Naz. Soc. It. Microbiol., pp. 251-252.
- RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M. e STANIER R.Y. (1979): *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria*, «J. Gen. Microbiol.», 111, pp. 1-61.
- RIPPKA R. (1988): *Recognition and classification of Cyanobacteria*, in "Cyanobacteria", Pachter L. & Glaser A. N. (eds.), Methods in Enzymol., Vol. I, 167, pp. 28-67.
- RIPPKA R., CASTENOLTZ R. W., ITEMAN I. e HERDMAN M. (2001): *Form-genus IV. Cyanospira Florenzano, Sili, Pelosi and Vincenzini 1985, 305*, in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition" Springer-Verlag. Boone D. R. & Castenholz R. W. (eds.), Volume One, pp. 570-571.
- SILI C., PELOSI E., VINCENZINI M. (1983): *Prime esperienze di coltura massiva di Spirulina jeneri e S. laxissima*, Atti XX Congr. Naz. Soc. It. Microbiol., pp. 129-131.
- SILI C., PELOSI E., VINCENZINI M., MATERASSI R., FLORENZANO G. (1984): *Production and preliminary characterization of a polysaccharide from the cyanobacterium Cyanospira capsulata nov. sp. (ex Anabaena spiroides)*, Atti "Third European Congress on Biotechnology", Vol. I, pp. 91-96.
- SILI C., ENA A., MATERASSI R., M. VINCENZINI (1994): *Germination of desiccated aged akinetes of alkaliphilic cyanobacteria*, «Archives of Microbiology», 162, pp. 20-25.
- SILI C. e VINCENZINI M. (1994): *Heterocyst differentiation in young germlings of two cyanobacterial strains*, Atti del "VII International Symposium on Phototrophic Prokaryotes", Urbino, p. 147.
- SILI C., ABDULQADER G., TREDICI M. R (1999): *Photosynthetic biocenosis of two soda lakes of the north-east fringe of lake Chad*, In Abstracts of the 8<sup>th</sup> International Conference of Applied Algology "Algae and human affairs in the 21<sup>st</sup> Century", Montecatini Terme, p. 318.
- SILI C. (2005): *Cyanoprokaryota in African alkaline habitats*, in Quintana A.M. & Onis E.S. (eds.), Tropical and Subtropical Cyanoprokariota Workshop (TSC/05), Program and Abstracts Book, Gran Canaria, p. 25 (Abstract).
- STANIER R. Y. & COHEN-BAZIRE G. (1977): *Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria*, «Ann. Review of Microbiol.», 31, pp. 225-274.
- STIZENBERGER E. (1852): *Spirulina und Arthrospira (nov. gen.)*, «Hedwigia», 1, pp. 32-41.
- TOMASELLI L., PELOSI E., MATERASSI R. e FLORENZANO G. (1969): *Prime esperienze in Italia di coltura massiva di una microalga verde-azzurra, ricca di proteine (Spirulina platensis f. granulata)*, XV Cong. Naz. Soc. It. Microbiol., pp. 3-10.

- TOMASELLI L., MARGHERI M. C., PELOSI E., RICCI D., SILI C. (1978): *Ecologia cianobatterici ed alghe di alcuni laghi del distretto di Nakuru (Kenia)*, Atti XVIII Congr. Naz. Soc. It. Microbiol., Vol. I, pp. 391-399.
- TOMASELLI L., PALANDRI M.R. e TREDICI M.R. (1996): *On the correct use of the Spirulina designation*, Arch. Hydrobiol., Suppl. 117, «Algological Studies», 83, pp. 539-548.
- TOMASELLI L. (1997): *Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of Arthrospira (Spirulina) maxima and Arthrospira (Spirulina) platensis*, in *Spirulina platensis (Arthrospira)*, Physiology, Cell-biology and Biotechnology, Vonshak A. (ed.), Taylor & Francis Ltd, London, UK, pp. 1-19.
- VINCENZINI M., DE PHILIPPIS R., SILI C. e MATERASSI R. (1990a): *A novel exopolysaccharide from a filamentous cyanobacterium: production, chemical characterization and rheological properties*, in "Novel Biodegradable Microbial Polymers", E.A. Dawes (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Olanda, pp. 295-310.
- VINCENZINI M., DE PHILIPPIS R., SILI C. e MATERASSI R. (1990b): *Studies on exopolysaccharide release by diazotrophic batch cultures of Cyanospira capsulata*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 34, pp. 392-396.
- VINCENZINI M., DE PHILIPPIS R., SILI C. e MATERASSI R. (1993): *Stability of molecular and rheological properties of the exopolysaccharide produced by Cyanospira capsulata cultivated under different growth conditions*, «Journal of Applied Phycology», 5, pp. 539-541.
- VONSHAK A., TOMASELLI L. (2000): *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. In: *The Ecology of Cyanobacteria; Their Success in Time and Space*, Whitton B.A. and Pott M. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. Cap. 18: pp. 505-522.
- WITTROCK e NORDSTEDT (1844): *Algae aquae dulcia exiccata*, Fascicule XIV n. 679, in *Descriptiones systematicae dispositae*, p. 59.

