

F. M. GEROLA, GIOVANNA TARANTOLA e MARIA BASSI

PROCARIOTI PARASSITI IN EUGLENA

Casi di parassitismo endocellulare in Alghe microscopiche e, in particolare, nelle *Euglenophyceae* sono stati segnalati fin dalla fine del secolo scorso (DANGEARD, 1895, 1902, 1933; CHATTON e BRODSKY, 1909; NÄGLER, 1911; MATTES, 1924; MITCHELL, 1928; JAHN, 1933; JOHNSON, 1939; KIRBY, 1941, 1944; BALL, 1969). Questi casi di endoparassitismo sono stati attribuiti a funghi inferiori (*Chytridiales*) quasi tutti appartenenti ai generi *Sphaerita* e *Pseudosphaerita*, anche se talora non è stato possibile riconoscere la presenza di un vero nucleo nell'organismo ospite.

Meno numerose sono state le segnalazioni di Procarioti parassiti di *Euglena*. Ne sono stati descritti tuttavia da DANGEARD (1901), da PÉREZ-REYES e SALAS GOMEZ (1961) e da LEEDALE (1966). DANGEARD attribuisce queste infezioni a *Caryococcus hypertrophicus*, una forma cocciforme della quale non vengono fornite le dimensioni e che si annida nel nucleo delle Euglene, provocandone una evidente ipertrofia. Varie altre specie di *Caryococcus*, tutte cocciformi e di dimensioni molto ridotte (da 0,5 a 1,5 μ di diametro), sono state successivamente trovate da KIRBY (1941 e 1944) nel nucleo o nel citoplasma di alcune specie di Flagellati (collocate nel genere *Triconympha*), che vivono nell'intestino delle termiti. LEEDALE (1966), infine, in una breve comunicazione, accenna alla presenza di batteri bacilliformi avvolti da materiale mucoso nell'interno del nucleo di *Euglena spirogyra*. Lo stesso autore riferisce anche sulla presenza in *Trachelomonas* e *Strombomonas* di batteri endonucleari che assomigliano a quelli indicati da UEDA (1960), come corpi elettroni-densi nel nucleo di *Trachelomonas*, che, tuttavia, a nostro avviso, sono di molto dubbia interpretazione.

In una nota precedente (GEROLA e BASSI, 1978) avevamo descritto la presenza di Procarioti nel citoplasma di una *Euglena* rossa trovata in un corpo d'acqua del Trentino. Tali Procarioti presentavano caratteristiche peculiari, quali dimensioni molto piccole, assenza di parete, forma notevol-

mente allungata. L'*Euglena* è stata in seguito identificata come una specie nuova e denominata *E. tonzigi*.

Poiché in un altro corpo d'acqua del Trentino abbiamo identificato un'altra specie di *Euglena* rossa, anch'essa nuova (*E. pinetana*), abbiamo voluto vedere se anche in questa vi fossero individui portatori di parassiti. Ne abbiamo infatti trovati alcuni, nei quali però i parassiti avevano una localizzazione diversa. In questa nota riportiamo le caratteristiche di questi Procarioti e le confrontiamo con quelle dei Procarioti ospiti di *E. tonzigi*.

MATERIALI E METODI

Le Euglene sono state fissate in glutaraldeide al 2% (in tampone fosfato o in tampone cacodilato a pH 6,9), immergendo direttamente porzioni di neuston nel liquido fissativo. Dopo postfissazione in acido osmico al 2%, le Euglene sono state disidratate nella serie degli alcool e incluse in Epon-Araldite. Le sezioni ultrasottili sono state colorate con acetato di uranile e quindi osservate al microscopio elettronico (Siemens Elmiskop IA e Hitachi 11B).

La *Euglena tonzigi* proviene da un corpo d'acqua situato presso le Casare di Campolongo in prossimità del confine tra la provincia di Trento e quella di Vicenza (GEROLA ET AL., 1979a e 1979b) la *E. pinetana* dall'acqua di tracimazione del Laghestel, sull'altopiano di Piné (GEROLA ET AL., 1979a e 1979b).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In un certo numero di individui del neuston rosso formato dalla *Euglena tonzigi* sono stati osservati nel citoplasma, ma non nel nucleo o in altri organuli, dei vortici di batteri. Questi vortici sono formati da numerosi individui tra di loro a contatto con le estremità e più o meno ricurvi, così da dare origine a delle colonie sferoidali, nel cui interno i batteri sono disposti a spirale. Questi vortici sono più o meno numerosi anche in un solo individuo e appaiono distribuiti apparentemente a caso in ogni parte della cellula, però sempre, come abbiamo ricordato, nella porzione citoplasmatica (fig. 1).

In sezioni trasversali, i batteri appaiono sferici o leggermente ellissoidali con diametri trasversali che raggiungono appena 0,25-0,30 μ . Nelle sezioni longitudinali i batteri appaiono molto allungati, fino a circa una decina di volte il loro diametro trasversale. Ogni batterio è avvolto e ben delimitato da una propria membrana unitaria, ma è privo di parete.

Nell'interno di questi batteri sono visibili qua e là delle porzioni trasparenti ai raggi elettronici, nelle quali sono individuabili delle sottilissime fibrille, ciò che fa ritenere che si tratti di nucleoidi. Nei batteri sezionati trasversalmente, verso la loro parte centrale, è visibile una piccola porzione fortemente elettrondensa, di significato non ancora determinato. In molti individui sono inoltre presenti numerose granulazioni, per lo più addensate, ed esse pure elettrondense, che con verosimiglianza sono da considerare come granuli di glicogeno. Nei batteri sezionati longitudinalmente queste granulazioni tendono ad accumularsi alle due estremità opposte della cellula. Non sembra che l'alga ospite sottostia a processi degenerativi come conseguenza di questi batteri citoplasmatici parassiti, tuttavia sono osservabili alcune alterazioni di un certo numero di mitocondri. Tali alterazioni portano alla scomparsa delle creste mitocondriali ed ad una progressiva maggiore opacità agli elettroni di tutto lo stroma (fig. 2).

Nell'*Euglena pinetana* non sono mai stati rinvenuti Procarioti parassiti nel citoplasma, tuttavia in vari individui sono stati osservati batteri nell'interno del nucleo e precisamente sia nel nucleoplasma che nel nucleolo (fig. 3). Questi simbionti endonucleari non si presentano mai così allungati come quelli della *E. tonzigi* e, inoltre, essi non risultano mai addensati a vortice, ma semplicemente accostati in file semplici o a gruppi di forma variabile. Il loro diametro trasversale è leggermente superiore a quello dei batteri citoplasmatici della *Euglena tonzigi*, tuttavia, come quelli, essi posseggono una porzione centrale fortemente elettrondensa. Dai batteri della *E. tonzigi* si discostano tuttavia per la mancanza di granulazioni glicogeno-simili. Le Euglene infettate non presentano alcuna evidente alterazione citologica.

Per poter meglio studiare le caratteristiche di questi endosimbionti, soprattutto in relazione al loro modo di diffusione e alla loro capacità infettiva, se ne è tentato l'isolamento e la coltivazione «in vitro». Purtroppo, finora, questi tentativi non hanno portato a risultati positivi, così come negativi sono stati gli analoghi tentativi effettuati da vari altri Autori sugli endosimbionti privi di una evidente parete (LAHNAM, 1968; CHANG e MUSGRAVE, 1972).

Da segnalare, tuttavia, che l'aggiunta di limitate porzioni di neuston a colture pure di *Euglena gracilis* ha provocato la morte più o meno rapida di tutta la coltura. Anche in questo caso però non si può escludere che ciò sia dovuto alla presenza di comuni inquinanti e non alla trasmissione di endobatteri parassiti. Tanto più che non è ancora accertato il modo di diffusione e di infezione di questi organismi che, probabilmente, come nel caso di altri endosimbionti privi di parete, sono trasmessi da individuo

a individuo per una loro distribuzione alla discendenza durante le divisioni dell'ospite.

Dato che nella *E. pinetana* le divisioni cellulari avvengono allo stadio incistato, proprio in questo stadio dovrebbe avvenire anche l'incremento del numero degli individui infettati, in una specie di trasmissione ereditaria, analoga a quella constatata per altri endosimbionti privi di parete. Anche a questo riguardo sono in corso indagini, rese però complesse dalle difficoltà di stabilire sia le condizioni che favoriscono la divisione delle Euglene sia il periodo (diurno o notturno) in cui avvengono tali divisioni. Da notare che RABINOVITCH e PLAUT (1962) hanno potuto accertare in *Amoeba proteus* che la quantità di DNA citoplasmatico, riferibile con probabilità alla presenza di endoparassiti, allo stadio di predivisione risulta doppia di quella determinata in fase non moltiplicativa.

La classificazione dei batteri endoparassiti risulta sempre molto difficile, salvo che non si riesca ad ottenerne colture pure, al di fuori dell'ospite. Prova ne sia che essi sono per lo più collocati in appendice a tutto il *taxon* delle *Bacteriophyta* (BREED ET AL., 1957) oppure sono semplicemente denominati simbionti endocellulari (in senso lato), senza tentarne nemmeno una approssimata collocazione sistematica (LAHMAN, 1968; CHANG e MUSGRAVE, 1972).

Infatti CHANG (1975) e CHANG e MUSGRAVE (1972) si limitano ad affermare che gli endosimbionti da loro osservati in *Helochara* e in alcuni Tripanosmi sono probabilmente da considerare come protoplasti, sferoplasti e L-forme di Batteri Gram-negativi o Gram-positivi.

Per questi stessi Batteri viene anche descritta la presenza di una duplice o triplice membrana unitaria. Solo quella più interna corrisponderebbe però al plasmalemma batterico, mentre le altre sarebbero originate dall'organismo ospite, analogamente a quanto è stato descritto anche per i Rizobi simbionti nelle radici delle Leguminose (GRILLI, 1965). LAHNAM (1968) è dell'opinione che la mancanza di una parete rigida nei batteri endosimbionti sia da riferirsi ad un adattamento dovuto al fatto che la simbiosi si sarebbe istituita da lunghissima data.

Come abbiamo accennato (GEROLA e BASSI, 1978), i Batteri endosimbionti delle Euglene per le loro dimensioni molto ridotte e per la mancanza di una parete possono venire ravvicinati ai Micoplasmii, essi pure comprendenti forme endoparassite. Anche le forme allungate dei batteri endocellulari osservati nella *E. tonzigi* ricordano analoghe forme di Micoplasmii, come sono state osservate nei cribri di varie piante (LOMBARDO ET AL., 1970). Un altro punto di contatto con i Micoplasmii riguarda la mancanza nelle Euglene di membrane prodotte dall'ospite, che delimitano

le cellule batteriche, e che sono invece quasi sempre presenti, come abbiamo ricordato, in altri casi di endoparassitismo dovuto a Batteri. Tuttavia, dai Micoplasmi essi si discostano per l'accumulo nelle loro cellule di granulazioni glicogeno-simili e per la presenza di una porzione fortemente elettrodensa nella loro parte mediana.

Dato che gli endosimbionti della *E. tonzigi* non concordano con quelli della *E. pinetana* per la differente localizzazione endocellulare, la diversità delle colonie, le dimensioni e la forma un po' diversa, riteniamo probabile che si tratti di due specie differenti di Batteri, per le quali proponiamo rispettivamente la denominazione di *Endobacillus euglenae* (per la forma che infetta la *Euglena tonzigi*) e di *Endobacillus nuclei* per la forma che si rinviene solo nel nucleo della *Euglena pinetana*.

BIBLIOGRAFIA

- BALL G. H., 1969, *Organisms living on and in Protozoa*, in «Tze-Tuan Chen», Research in Protozool., 3: 565-718.
- BREED R. S., MURRAY E. G. D., SMITH N. R., 1957, *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, Ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimora.
- CHANG K. P., 1975, *Haematophagous insect and haemoflagellate as hosts for prokariotic endosymbionts*, in «Symbiosis» Symp. Soc. Exper. Biol. XXIX, 407-428 Cambr. Univ. Press, Cambridge.
- CHANG K. P., MUSGRAVE A. J., 1972, *Multiple symbiosis in a leaf-hopper, Helochara communis Fitch (Cicadellidae: Homoptera): Envelopes, nucleoids and inclusions of the symbiotes*, J. Cell Sci., 11: 275-293.
- CHATTON E., BRODSKI A., 1909, *Le parasitisme d'une Chytridinée du genre Sphaerita Dangeard chez Anabaena limax Dujard. Etude comparative*, Archiv f. Protistenkunde, 17: 1-18.
- DANGEARD P. A., 1895, *Parasites du noyan et du protoplasma*, Le Botaniste, fasc. 6.
- DANGEARD P. A., 1901, *Le caryophysème des Eugléniens*, Le Botaniste, ser. 8: 358-360.
- DANGEARD P. A., 1902, *Recherches sur les Eugléniens*, Le Botaniste, T. 8.
- DANGEARD P. A., 1933, *Nouvelles observations sur les parasites des Eugléniens*, Le Botaniste, 25: 3-55.
- GEROLA F. M., BASSI M., 1978, *A case of parasitism in Euglena*, J. Submicr. Cytol., 10: 261-263.
- GEROLA F. M., BASSI M., TARANTOLA G., 1979a, *Two new species of Euglena found in two alpine water pools. Light and electron microscopic observations*, J. Submicr. Cytol., in corso di stampa.
- GEROLA F. M., TARANTOLA G., BASSI M., 1979b, *Indagini sull'arrossamento di due corpi d'acqua del Trentino*, Studi Trentini di Sc. Nat., in corso di stampa.

- GRILLI M., 1965, *Fine structural differences in the bacteroids of the root nodules of some leguminous plants*, Atti V Congresso di Microscopia Elettronica - Bologna, 5-7 ottobre 1965.
- JAHN T. L., 1933, *On certain parasites of Phacus and Euglena; Sphaerita phaci, sp. nov.* Archiv f. Protistenkunde, 79: 249-355.
- JOHNSON L. P., 1939, *A study of Euglena rubra Hardy 1911*, Trans. Amer. Microsc. Soc., 58: 42-48.
- KIRBY JR. H., 1941, *Organisms living on and in Protozoa*, in «Protozoa in Biological Research», eds. G. N. Calkins and F. M. Summers, Columbia Univ. Press; New York: 1009-1113.
- KIRBY JR. H., 1944, *The structural characteristics and nuclear parasites of some species of Trichonympha, in Termites*, Univ. Calif. Publ. Zool., 49: 185-282.
- LAHNAM U. N. 1968, *The Blochmann bodies: hereditary intracellular symbionts of insects*, Biol. Rev., 43: 269-286.
- LEEDALE G. F., 1966, *Endonuclear bacteria in euglenoid flagellates*, J. Protozool., 13 suppl. 22: 22.
- LOMBARDO G., BASSI M., GEROLA F. M., 1970, *Mycoplasma development and cell alterations in white clover affected by clover dwarf. An electron microscopy study*, Protoplasma, 70: 61-71.
- MATTES O., 1924, *Über Chytridineen im Plasma und Kern von Amoeba sphaeronucleolus und Amoeba terricola*, Archiv f. Protistenkunde, 47: 414-430.
- MITCHELL J. B. JR., 1928, *Studies on the life history of a parasite of the euglenoidae*, Trans. Am. Microsc. Soc., 47: 29-41.
- NÄGLER K., 1911, *Studien über Protozoen aus einem Almtümpel. II. Parasitische Chytridiaceen in Euglena sanguinea*, Archiv f. Protistenkunde, 23: 262-267.
- PÉREZ-REYES R., SALAS GOMEZ E., 1961, *Euglenae del valle de Meico. IV. Descripcion de algunos endoparasitos*, Rev. latino-amer. Microbiol., 4: 53-73.
- RABINOVITCH M., PLAUT W., 1962, *Cytoplasmic DNA synthesis in Amoeba proteus. II. On the behavior and possible nature of the DNA-containing elements*, J. Biophys. Biochem. Cytol., 15: 535-540.
- UEDA K., 1960, *Structure of plant cells with special reference to lower plants. IV. Structure of Trachelomonas*, Cytologia Tokio, 25: 8-16.

RIASSUNTO - Viene descritto un endobatterio localizzato nel nucleo della *Euglena pinetana*, un'alga che provoca l'arrossamento delle acque che trascinano dal Lagbestel (Altopiano di Piné, Trento), e ne vengono raffrontate le caratteristiche con quelle di un endobatterio, a localizzazione citoplasmatica, osservato nella *E. tonzigi*. Nella *Euglena pinetana* i batteri simbiotici sono stati trovati sia nel nucleoplasma che nel nucleolo, dove essi appaiono isolati o riuniti in piccoli gruppi. Sia i batteri endosimbionti della *E. pinetana*, sia quelli della *E. tonzigi* sono delimitati da una membrana unitaria. Le differenze di grandezza e di forma (sia dei singoli individui, sia delle colonie) e le diversità di localizzazione nell'interno delle *Euglene* fanno ritenere che si tratti di due specie differenti di batteri ai quali è stato assegnato il nome di *Endobacillus euglenae* (per la forma che infetta la *Euglena tonzigi*) ed *E. nuclei*, per la specie che è stata trovata nella *E. pinetana*.

SUMMARY – An endobacterium is described, which lives in the nucleus of *E. pinetana*, a red *Euglena* found in a water pool of Piné (Trento). Its morphology is compared with that of another endobacterium, which lives in the cytoplasm of another *Euglena*, *E. tonzigi*. In *E. pinetana* the endobacteria are localized both in the nucleoplasm and nucleolus, single or grouped in small clusters. Both kinds of bacteria are delimited by a unit membrane. Since they differ in size and shape and also in disposition inside their host, they are thought to be two different species, which have been named *Endobacillus nuclei* and *Endobacillus euglenae*, respectively.

Indirizzo degli autori:

Filippo M. Gerola, Ist. Sc. Bot., Università - Via G. Colombo, 60 - 20133 Milano - Italy

Maria Bassi, Ist. di Botanica, Università di Ferrara - Ferrara - Italy

Giovanna Tarantola, Centro Microsc. Elettr., Politecnico di Milano - Milano - Italy

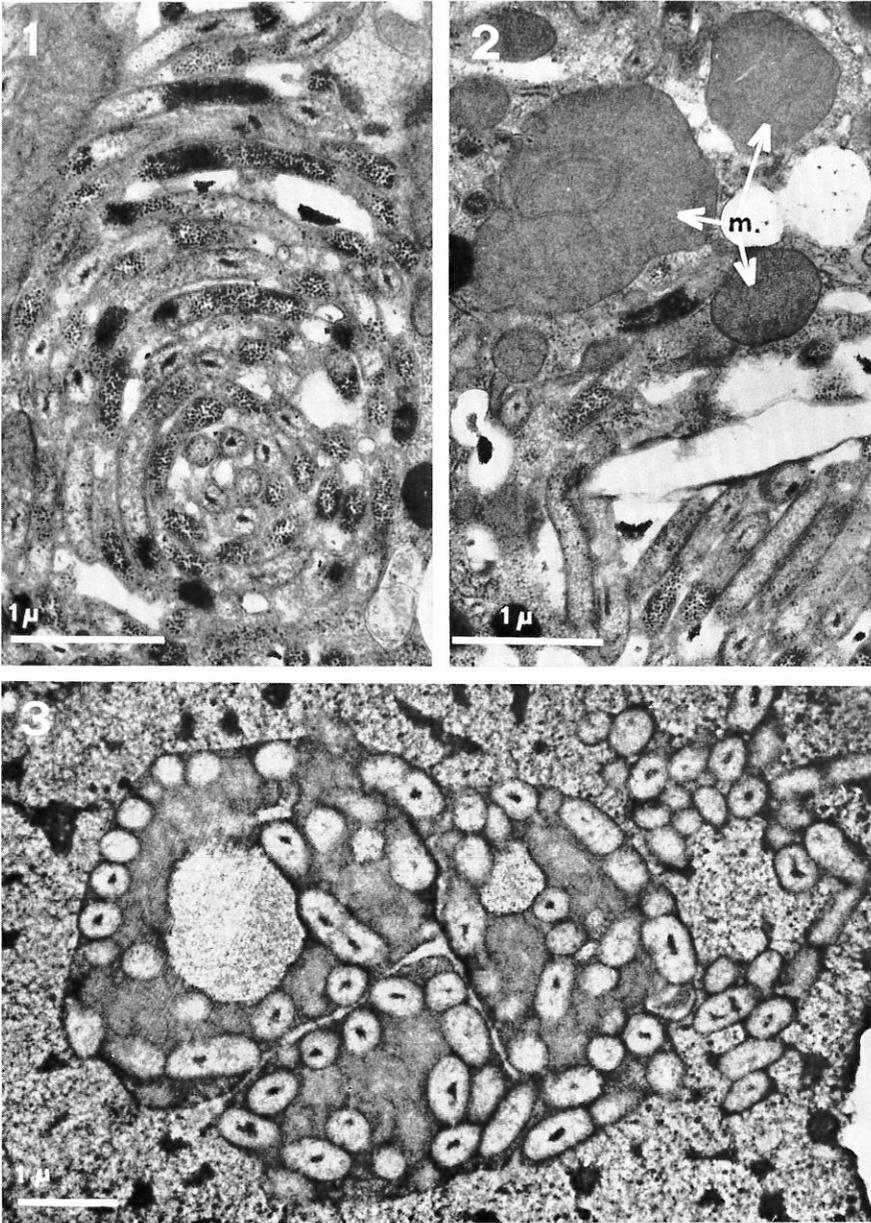


Fig. 1 - Batteri viventi nel citoplasma di *E. tonzigi*. Essi contengono granuli di glicogeno e sono disposti in vortici.

Bacteria living in the cytoplasm of *E. tonzigi*. They contain glycogen particles and are arranged in whorls.

Fig. 2 - Porzione di citoplasma di *E. tonzigi* che mostra dei mitocondri anomali in cui le cristae sono scarsamente visibili. Nella porzione inferiore della foto è osservabile un insieme di batteri. m = mitocondri.

Portion of cytoplasm of *E. tonzigi*, showing anomalous mitochondria in which the cristae are scarcely visible. At the bottom, a cluster of bacteria. m = mitochondria.

Fig. 3 - Nucleo di *E. pinetana*, in cui sono visibili numerosi batteri localizzati sia nel nucleolo che nel nucleoplasma.

Nucleus of *E. pinetana*, showing many bacteria localized both in the nucleolus and in the nucleoplasm.

