

**ASPETTI DELL' ASSOCIAZIONE
TRA *CHONDRILLA NUCULA* SCHMIDT (DEMOSSPONGIAE)
E MICROORGANISMI SIMBIONTI (BATTERI E CIANOFICEE)
IN CONDIZIONI NATURALI E Sperimentali (1)**

par

Elda Gaino, Maurizio Pansini e Roberto Pranzato
Istituto di Zoologia dell'Università Via Balbi, 5 - 16126 Genova (Italia)

Résumé

Aspects de l'association entre *Chondrilla nucula* Schmidt (Demospongiae) et ses micro-organismes symbiotiques (bactéries et Cyanophycées) en milieux naturels et expérimentaux.

Les auteurs ont effectué des recherches sur les micro-organismes symbiotiques extracellulaires — bactéries et Cyanophycées Chroococcales — vivant dans la Démosponge *Chondrilla nucula* Schmidt. La présence des Cyanophycées déterminant la pigmentation superficielle de l'éponge et la protégeant contre l'irradiation lumineuse excessive, le fait de retrouver des exemplaires partiellement ou totalement dépigmentés en milieu éclairé est d'importance. Dans ces Eponges, ont été observées la distribution et la morphologie des micro-organismes symbiotiques en milieu naturel.

La recherche a été conduite également dans des conditions expérimentales, faisant passer des exemplaires de *Chondrilla* normalement pigmentés d'une zone éclairée à une zone sombre.

Introduzione

Le Demospongie marine presentano sovente associazioni con microorganismi quali alghe unicellulari e batteri.

L'interesse di queste associazioni dal punto di vista ecologico e fisiologico è stato sottolineato in numerosi lavori (Sarà e Vacelet, 1973). Esse sono importanti perché consentono alla spugna ospite di disporre di una riserva trofica sfruttabile sia direttamente, mediante fagocitosi, sia indirettamente, utilizzando le sostanze elaborate dai simbionti (Brondsted e Brondsted, 1953). La presenza, inoltre, di Cianoficee Croococcali negli strati corticali di molti Poriferi ne determina la pigmentazione, proteggendo anche la spugna da eccessiva irradiazione (Sarà, 1964).

Per quanto riguarda, in particolare, *Chondrilla nucula*, è stata osservata la presenza di Cianoficee Croococcali simbionti attribuite

(1) Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R. e presentato all'8^o Congresso della Società Italiana di Biologia Marina, Taormina 19-23 Maggio 1976.

ad *Aphanocapsa feldmanni* (Sarà e Liaci, 1964) reperibili anche a livello degli ovociti (Scalera Liaci e coll., 1973).

L'indagine ultrastrutturale condotta su *C. nucula* (Gaino e coll., in corso di stampa) ha permesso di studiare la morfologia della Cianoficea simbionte, di stabilire la sua posizione extracellulare e la sua distribuzione nel corpo della spugna. L'apparato fotosintetico di questi simbionti può presentare un numero variabile di spire; le alghe con tilacoide a poche spire si trovano sempre nel mesoilo corticale di *Chondrilla*, mentre quelle con più spire ne caratterizzano la parte profonda. Esemplici di *Chondrilla* trasportati in ambiente oscuro ed ivi rimasti per due mesi, hanno mosrato nello strato superficiale una netta diminuzione nel numero delle alghe simbionti, e la sopravvivenza solo delle forme con tilacoide a molte spire. Sono state, inoltre, notate forme batteriche che, per la loro costante presenza nel corpo della spugna, si possono considerare simbionti.

Tali ricerche sono state proseguiti nel presente lavoro, prendendo in considerazione : a) esemplari di *Chondrilla* portati in grotta semioscura ed ivi rimasti per un anno ; b) esemplari di *Chondrilla* normalmente viventi in grotta oscura ; c) esemplari di *Chondrilla* provenienti da zone illuminate che presentano colorazione varia (verde, screziata di bianco, bianca), al fine di mettere in evidenza eventuali variazioni dei simbionti, e la loro importanza nei processi trofici della spugna ospite.

Metodi

I campionamenti sono stati effettuati nella zona di Portofino (Riviera Ligure di Levante) ed all'interno della Grotta del Mago (Isola d'Ischia).

In ambiente di grotta oscura (Grotta del Mago — luminosità 0,0006 p. 100 dei valori registrati in superficie), a circa due metri di profondità, sono stati prelevati esemplari di *Chondrilla* completamente bianchi. Numerosi esemplari di *Chondrilla* insediati su piccole rocce raccolte a circa 12 m di profondità, in zona ben illuminata (5,5 p. 100 dei valori registrati in superficie), sono stati trasferiti in ambiente di grotta semioscura (Punta di Portofino — luminosità 0,02 p. 100 dei valori di superficie) a circa 35 m di profondità e successivamente prelevati ad intervalli di tempo, per osservare il comportamento dei simbionti al variare dell'irradiazione luminosa. Il periodo massimo di permanenza in ambiente semioscuro è stato di un anno. In prossimità di Punta Cajeca, infine, a circa 20 m di profondità (luminosità 5,6 p. 100 dei valori di superficie), sono stati prelevati su superfici di uguale orientamento esemplari di *C. nucula* di colore verdastro, verde screziato di bianco e bianco.

Per le osservazioni in microscopia fotonica sono state preparate sezioni di *Chondrilla* di spessore variabile tra 5 e 20 μ con la tecnica del microtomo congelatore e quindi osservate in fluorescenza con microscopio Wild M 20.

Per le osservazioni in microscopia elettronica gli esemplari di *Chondrilla* sono stati prefissati in gluteraldeide al 2,5 p. 100 in

acqua di mare portata a pH 7,5-8 con NaOH 0,1 N subito dopo il prelievo, in maniera da prevenire ogni alterazione del materiale. Dopo tre ore di prefissazione sono stati effettuati in laboratorio ripetuti lavaggi con acqua di mare addizionata di 6,5 g/l di NaCl a temperatura tra 5° e 10 °C. La postfissazione è stata eseguita con tetrossido di osmio al 2 p. 100 in acqua di mare. Parte dei preparati è stata inclusa in Epon e parte in Durcupan, e le sezioni successivamente ottenute, contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, sono state osservate con microscopi Hitachi HU 11 e Zeiss EM 9 S — 2.

Risultati

Dopo un anno di soggiorno in grotta, gli esemplari di *Chondrilla nucula* appaiono completamente depigmentati. Osservazioni di sezioni in fluorescenza rivelano la completa scomparsa delle Cianoficee dalla zona corticale, dove normalmente esse sono assai numerose. La spugna — come si può vedere con l'esame ultrastrutturale — non presenta alterazioni in seguito al cambiamento sperimentale di ambiente ed alla perdita delle Cianoficee simbionti. Nella zona corticale permangono cellule mobili (collenciti, lofociti) in una abbondante matrice di collagene che l'assenza delle alghe rende assai più evidente (Tavola I, b, c). Per quanto riguarda i batteri simbionti, essi, nella parte più esterna dello strato corticale, continuano ad essere in numero ridotto rispetto alle condizioni normali, mentre aumentano di numero nella parte più profonda, dove si osservano sia fenomeni di degenerazione dei batteri nel mesolio, sia fenomeni di fagocitosi da parte delle cellule mobili (Tavola I, a).

Una situazione analoga si riscontra in alcuni piccoli esemplari raccolti in grotta completamente oscura. L'unico dato di un certo interesse è costituito dalle ridotte dimensioni raggiunte da questa specie tipicamente fotofila in un ambiente per lei inconsueto.

Le forme depigmentate di *Chondrilla* erano state finora osservate o in ambiente di grotta o trasferendo sperimentalmente esemplari normalmente pigmentati in zone oscure. E' quindi di particolare interesse il ritrovamento — in zona ben illuminata anche se non superficiale (circa 20 metri di profondità) di esemplari sia parzialmente che completamente depigmentati (Tavola V).

L'osservazione in fluorescenza delle sezioni di esemplari depigmentati, ha rivelato l'assenza completa dei simbionti algali nella zona corticale, analogamente a quanto osservato negli esemplari di grotta. La microscopia elettronica ha messo in evidenza ancora una volta, nella zona corticale, una abbondante matrice di collagene ed un numero estremamente ridotto di batteri (Tavola II, e, f). Anche in questo caso si osservano cellule mobili con pseudopodi e ricche di inclusi (Tavola II, c, d), e archeociti (Tavola II, b) che esplicano funzione fagocitaria circondando ed inglobando i batteri. I batteri in degenerazione si riconoscono per le alterazioni della parete cellulare (Tavola II, a). Procedendo verso l'interno sono visibili batteri di diversi tipi morfologici, a livello dei quali continua l'attività fagocitaria da parte delle cellule.

Gli esemplari di *Chondrilla* parzialmente depigmentati (screziati) presentano zone verdastre framiste a zone bianche, con una disposizione irregolare (Tavola V, foto in basso). In alcune sezioni superficiali che comprendono entrambe le zone è stata osservata in fluorescenza la distribuzione delle alghe simbionti. Le Cianoficee, piuttosto concentrate nella zona pigmentata, si diradano fino a diventare molto rare procedendo verso la parte bianca.

Con l'indagine ultrastrutturale si osserva nella zona pigmentata una abbondante componente batterica di morfologia varia (Tavola III, b, c), e numerose Cianoficee (Tavola III, a, b). Queste ultime tendono ad avere un apparato fotosintetico con tilacoide a più spire (Tavola III, a). Nella parte bianca della spugna non sono state individuate nei preparati le rare Cianoficee osservate invece in luce di Wood. Gli unici microorganismi presenti sono, anche in questo caso, batteri diffusi nella matrice collagene (Tavola III, f), in varie fasi di fagocitosi (Tavola III, d) o all'interno delle caratteristiche « cellules poche » (cellule tasca) (Bertrand e Vacelet, 1971). Tali cellule comunicano con l'esterno attraverso piccoli orifizi del loro sottile involucro citoplasmatico. All'interno di esse sono visibili i consueti batteri simbionti della spugna e fibre di collagene (Tavola III, e).

In sezioni più profonde di entrambe le zone, a livello delle camere coanocitarie, non si riscontrano differenze tra le parti in superficie pigmentate (Tavola IV, a) e bianche (Tavola IV, b) e la percentuale dei batteri simbionti diventa essai elevata. A differenza di quanto avviene a livello delle cellule mobili, quali, ad esempio, gli archeociti (Tavola IV, c), i coanociti non sembrano fagocitare tali microorganismi. In questa zona si osservano, inoltre, all'interno dei batteri, delle strutture che potrebbero essere interpretate come spore (Tavola IV, d).

Discussione

La permanenza in ambiente oscuro, realizzata in via sperimentale, di esemplari di *Chondrilla* dotati di un ricco corredo di microorganismi simbionti ci ha consentito sia di valutare la loro dipendenza dall'irradiazione luminosa, per quanto riguarda la parte algale, sia di trarre qualche informazione sulle loro interrelazioni.

La graduale e completa scomparsa delle Cianoficee simbionti nelle spugne mantenute in ambiente oscuro avviene in due fasi : a) scomparsa delle Cianoficee con tilacoide a poche spire dallo strato corticale (Gaino e coll., in corso di stampa) ; b) scomparsa delle altre Cianoficee con apparato fotosintetico più sviluppato. Questo fatto non provoca alcuna alterazione morfologica in *Chondrilla*. La spugna, cioè, è perfettamente in grado di svilupparsi anche senza il possibile apporto di vitamine o altre sostanze metaboliche fornite dalle alghe simbionti (Brondsted e Brondsted, 1953), e ciò è confermato dal ritrovamento di esemplari di *Chondrilla* viventi in ambiente completamente oscuro. Poiché questi esemplari sono insolitamente piccoli, si può ipotizzare che l'assenza delle Cianoficee possa rallentarne l'accrescimento.

Le Cianoficee simbionti in *Chondrilla* non sembrano influenzare la distribuzione dei batteri; essi, infatti, continuano ad essere in numero ridotto nello strato più esterno della spugna e ad aumentare nella parte profonda, anche in quegli esemplari naturalmente o sperimentalmente depigmentati.

La costanza dei vari tipi morfologici osservata per i batteri extracellulari di numerosi preparati di *Chondrilla*, fa pensare che si tratti di forme tipicamente simbionti. Esse sono oggetto di intensa fagocitosi da parte delle cellule mobili della spugna, che contribuiscono a mantenere un equilibrio nel numero di tali micro-organismi. Ci sembra, tuttavia, più corretto interpretare il processo in senso trofico, piuttosto che come difesa della spugna contro una eccessiva proliferazione di tali batteri. In *Verongia*, infatti, è stata osservata la comparsa di forme batteriche molto allungate, del tutto particolari e diverse da quelle tipicamente simbionti, quando la spugna andava incontro a fenomeni di degenerazione (Vacelet, 1975).

Poiché i batteri sono sempre presenti, a differenza delle alghe, essi costituiscono una riserva alimentare cui la spugna può attingere costantemente. La loro localizzazione è tipicamente extracellulare, dal momento che, all'interno delle cellule, essi si possono osservare solo in degenerazione. Unica eccezione è rappresentata dalle caratteristiche « cellules poche » (cellule tasca), all'interno delle quali i batteri, secondo quanto osservato in *Verongia* (Bertrand e Vacelet, 1971; Vacelet, 1975), non andrebbero incontro a processi digestivi.

La morfologia dell'apparato fotosintetico delle Cianoficee simbionti, caratterizzato da un tilacoide a spirale che non si osserva mai nelle forme libere, le differenzia chiaramente da queste ultime. Tale apparato fotosintetico può presentare uno o più giri di tilacoide, a seconda della localizzazione dell'alga nel corpo della spugna e quindi della maggiore o minore irradiazione luminosa cui essa è soggetta (Gaino e coll., in corso di stampa).

Poiché esemplari depigmentati di *Chondrilla nucula* erano stati osservati solo in ambiente oscuro, si pensava che la luce fosse l'unico fattore limitante la distribuzione e la presenza delle alghe simbionti. Il ritrovamento, in ambiente illuminato, anche se ad una profondità di circa 20 m, di esemplari parzialmente o totalmente depigmentati, fa pensare all'esistenza di altri fattori condizionanti lo sviluppo delle Cianoficee. È interessante sottolineare che, nelle forme screziate, anche nella zona corticale, l'apparato fotosintetico delle Cianoficee simbionti presenta un tilacoide a più spire.

L'esistenza delle forme di passaggio tra esemplari pigmentati e depigmentati avvalorà l'ipotesi secondo la quale *Chondrilla nucula* sarebbe una forma originariamente sciafila che ha conquistato, grazie alle Cianoficee simbionti, anche ambienti soggetti ad irradiazione solare diretta.

La graduata variazione nella concentrazione algale tra la zona pigmentata e quella chiara, fa pensare ad una diffusione dei simbionti nell'ambito dello stesso esemplare. La presenza, inoltre, in un popolamento costituito da forme normalmente pigmentate, di esemplari completamente bianchi o screziati, ripropone il pro-

blema della trasmissione dei simbionti algali. Tale trasmissione potrebbe verificarsi o per passaggio da un individuo all'altro, o, per via congenita, attraverso le uova. Si escluderebbe, infatti, la possibilità di infestazione attraverso Cianoficee libere, poiché finora non sono note forme non simbionti munite di un tilacoide a spirale, a meno che la spiralizzazione del tilacoide non rappresenti un'elevata capacità adattativa alla vita in simbiosi.

Poiché Cianoficee simbionti sono state segnalate in *Verongia* a livello dei canali esalanti (Vacelet, 1971), esisterebbe una via di emissione di questi microorganismi all'esterno attraverso il sistema acquifero, con possibile passaggio da un individuo all'altro.

Per quanto riguarda la trasmissione congenita, le Cianoficee sono state osservate a livello degli ovociti (Scalera Laci e coll., 1973), mancano, tuttavia, dati ultrastrutturali sull'argomento. Con indagini di questo tipo è stata invece studiata la trasmissione per via congenita dei simbionti batterici in alcune spugne ovipare. In *Verongia* essi sono localizzati all'interno di vacuoli citoplasmatici periferici delle cellule uovo (Gallissian e Vacelet, 1976). In *Chondrosia reniformis*, in particolare, tali microorganismi si trovano all'interno delle cellule follicolari che circondano l'uovo e sono quindi in grado di essere trasmessi dalla spugna madre alla giovane spugna (Lévi e Lévi, 1976).

Riteniamo quindi sia di particolare interesse condurre anche sugli ovociti di *Chondrilla nucula* un'indagine ultrastrutturale al fine di chiarire le modalità di trasmissione dei simbionti, soprattutto in relazione al ritrovamento in ambiente illuminato di esemplari bianchi e screziati nell'ambito di popolazioni normalmente pigmentate.

Ringraziamo vivamente il Prof. Michele Sarà per la revisione critica del testo.

Riassunto

E' stata condotta un'indagine sui microorganismi simbionti extracellulari (batteri e Cianoficee) di *Chondrilla nucula* Schmidt (Demospongiae). Poiché la presenza delle Cianoficee determina la pigmentazione della spugna e la protegge dall'eccessiva irradiazione luminosa, è di particolare interesse il ritrovamento in ambiente illuminato di esemplari parzialmente o totalmente depigmentati. In queste forme sono state osservate la distribuzione e la morfologia dei microorganismi simbionti nell'ambiente naturale. L'indagine è stata condotta anche in condizioni sperimentali, trasferendo esemplari normalmente pigmentati di *Chondrilla* da zone illuminate a zone oscure.

Summary

Aspects of the association between *Chondrilla nucula* Schmidt (Demospongiae) and its symbiotic microorganisms (bacteria and Cyanophyceae) in natural and experimental conditions.

A study of the symbiotic extracellular microorganisms (bacteria and Cyanophyceae) of *Chondrilla nucula* Schmidt (Demospongiae) has been carried on. Since the existence of pigmenting Cyanophyceae in the superficial layers of *Chondrilla* protects the sponge from excessive irradiation, making it fit to live on lighted bottoms, our findings of completely or partially white specimens in lighted environments are remarkable. On these specimens, the morphology and

distribution of symbiotic microorganisms in natural environment have been observed. The same study has been carried on, also in experimental conditions, by the transfer of normally pigmented *Chondrilla* specimens from lighted to darkened environments.

BIBLIOGRAFIA

- BERTRAND, J.-C. e VACELET, J., 1971. — L'association entre Eponges cornées et bactéries. *C.R. Ac. Se. Paris*, 273, pp. 638-641.
- BRONDSTED, H.v. e A., 1953. — The effect of symbiotic Zoochlorellae on the germination rate of gemmules of *Spongilla lacustris* (L.). *Vid. Medd. Dansk Nat. Foren.*, 115, pp. 133-144.
- GAINO, E., PANSINI, M. e PRONZATO, R. — Osservazioni sull'associazione tra una Cianoficea Croococciale e la Demospongia *Chondrilla nucula*. *Arch. Ocean. Limnol.*, (in corso di stampa).
- GALLISSIAN, M.F. e VACELET, J., 1976. — Ultrastructure de quelques stades de l'ovo-génèse de Spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *Ann. Sc. Naturelles, Zool.*, 12 S., 18, pp. 381-401.
- LÉVI, c. e P., 1976. — Embryogenèse de *Chondrosia reniformis* (Nardo), Démospunge ovipare et transmission des bactéries symbiotiques. *Ann. Se. Naturelles, Zool.*, 12 S., 18, pp. 367-380.
- SARA, M., 1964. — Associazioni di Demospongie con Zooxantelle e Cianelle. *Boll. Zool.*, 31, pp. 359-366.
- SARA, M. e LIACI, L., 1964. — Associazione fra la Cianoficea *Aphanocapsa feldmanni* ed alcune Demospongie marine. *Boll. Zool.*, 31, pp. 55-65.
- SARA, M. e VACELET, J., 1973. — Ecologie des Démospanges. In : « Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie : Spongiaires ». Grasse P.P., éd. Masson, Parigi, 3, pp. 462-576.
- ICALERA LIACI, L., SCISCIOLI, M. e MATARRESE, A., 1973. — Sexual reproduction in some sponges : *Chondrilla nucula* O.S. and *Chondrosia reniformis* Nardo (Tetractinomorpha). *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 22, pp. 129-130.
- VACELET, J., 1971. — Etude en microscopie électronique de l'association entre une Cyanophycée Chroococciale et une Eponge du genre *Verongia*. *J. Microscopie*, 12, pp. 363-380.
- VACELET, J., 1975. — Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et Spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microscopie Biol. Cell.*, 23, pp. 271-288.

TAVOLA I

Chondrilla nucula dopo un anno di permanenza in ambiente semioscuro.

a : fagocitosi e degenerazione di batteri nel mesoilo della zona interna; b : cellula mobile (probabilmente lofocita) nel mesoilo corticale; c : matrice collagene e cellule mobili nel mesoilo corticale.

TAVOLA II

Chondrilla nucula depigmentata in ambiente illuminato - Zona corticale.

a : batteri integri ed in fase di degenerazione in seguito a fagocitosi ; b : archeocita ; d : cellula microgranulare ; e : cellula mobile ricca di inclusi ; e, f : abbondante matrice di collagene ed archeociti in fagocitosi.

TAVOLA III

Chondrilla nucula screziata in ambiente illuminato - Zona corticale.

Zona pigmentata della spugna.

a : cianoficea in cui è visibile il caratteristico tilacoide a più spire; b : cianoficea (ci) e batteri ; c : particolare di uno dei batteri simbionti.

Zona depigmentata della spugna:

d : fasi di fagocito si batterica ; e : « cellule poche » (cellula tasca) contenente batteri e fibre di collagene; f : batteri dispersi nella matrice collagene.

TAVOLA IV

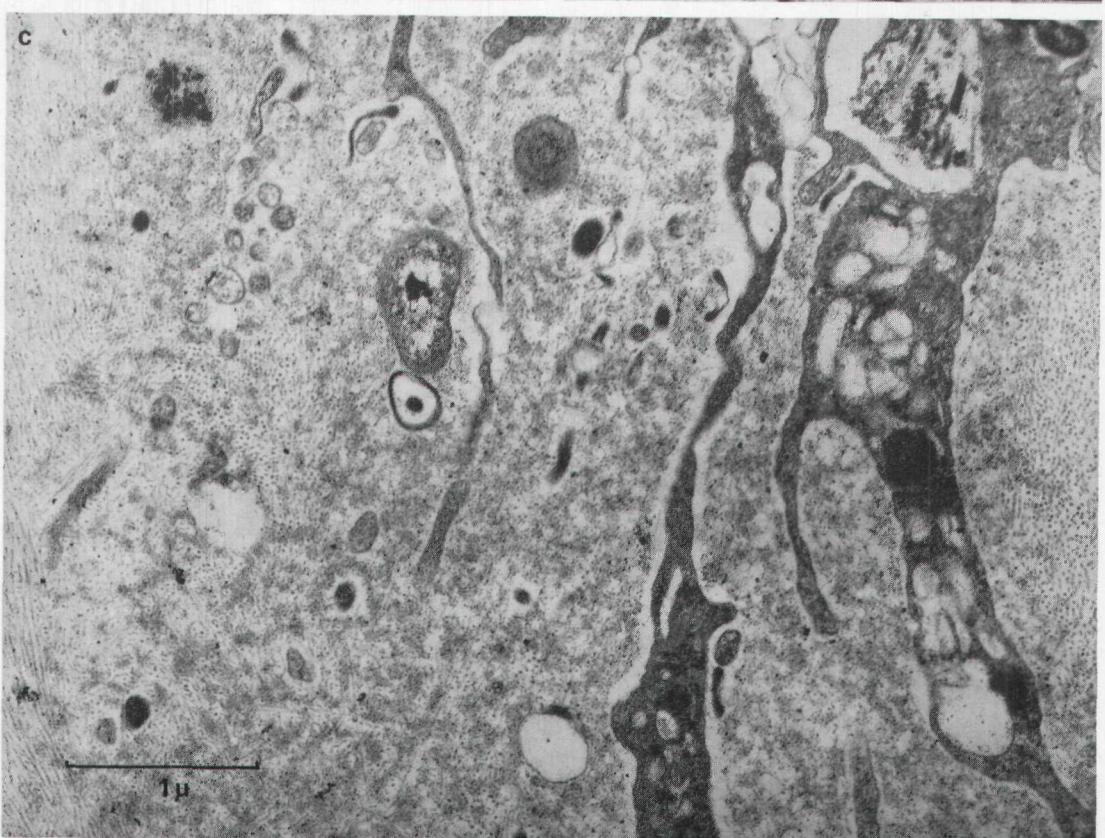
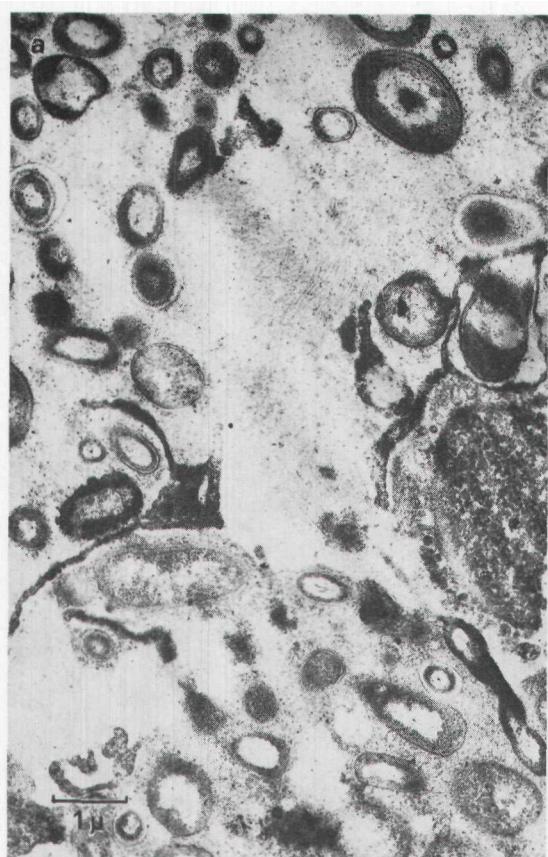
Chondrilla nucula screziata in ambiente illuminato - Zona midollare.

a, b: ricco popolamento batterico a livello del coanosoma dell'area pigmentata (a) e dell'area depigmentata (b) della spugna; c : particolare di archeocita in fagocitosi ; d : batteri di diversi tipi morfologici con probabile forma sporogena (—>).

TAVOLA V

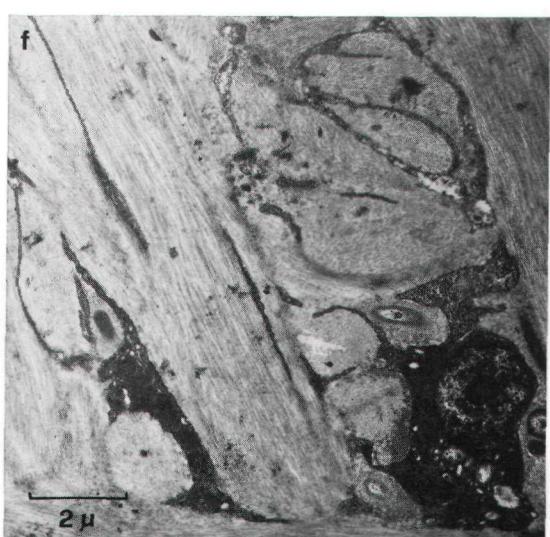
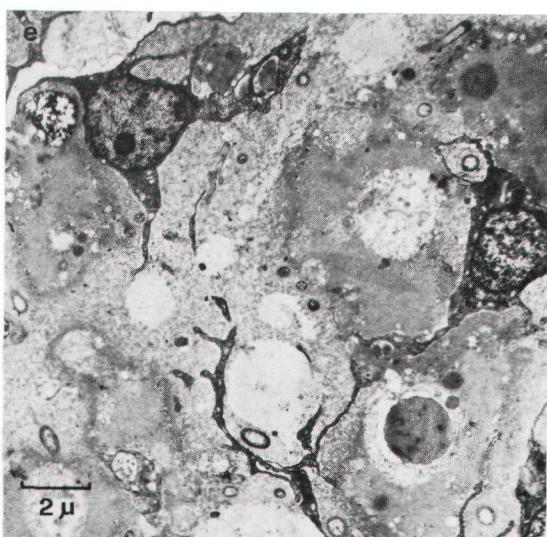
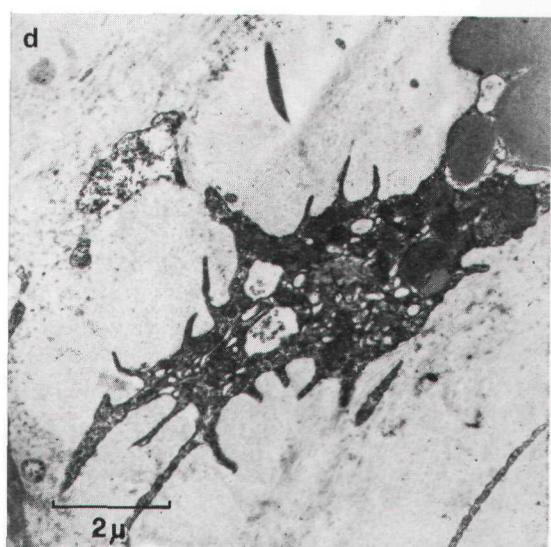
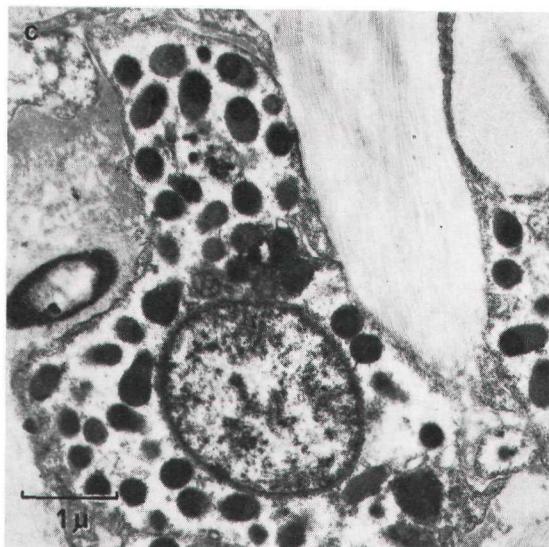
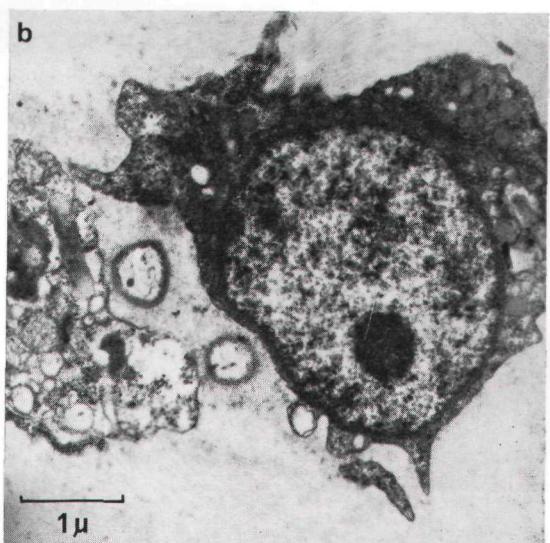
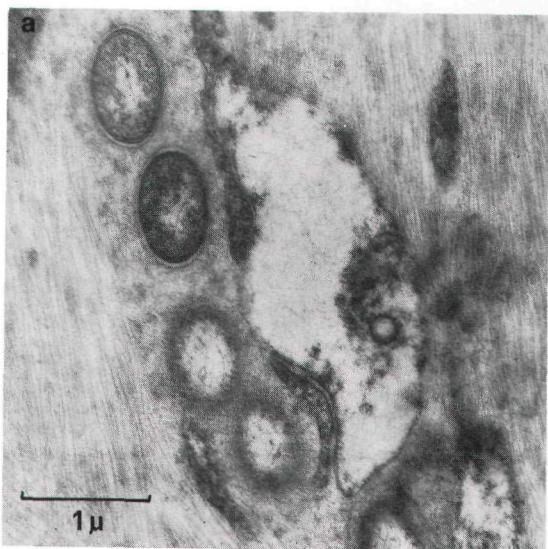
Esemplari di *Chondrilla nucula* completamente depigmentati, in ambiente illuminato su un fondale di circa 20 m (foto in alto).

Esemplari di *Chondrilla nucula* prelevati nello stesso ambiente in vari stadi di pigmentazione (foto in basso).



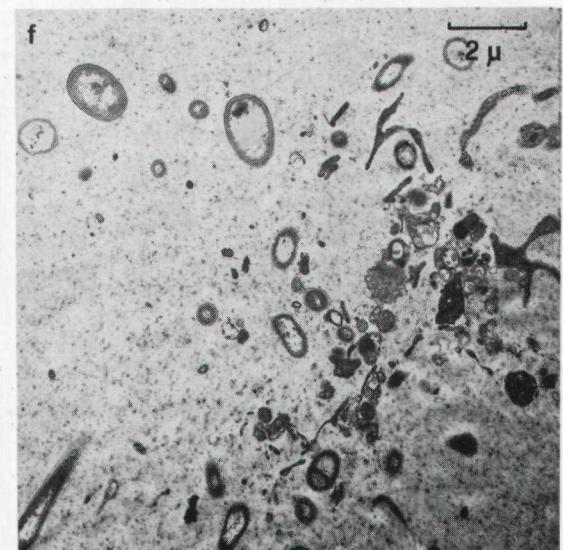
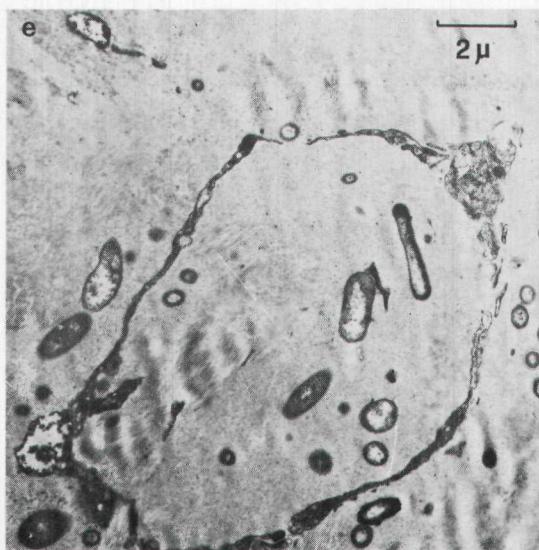
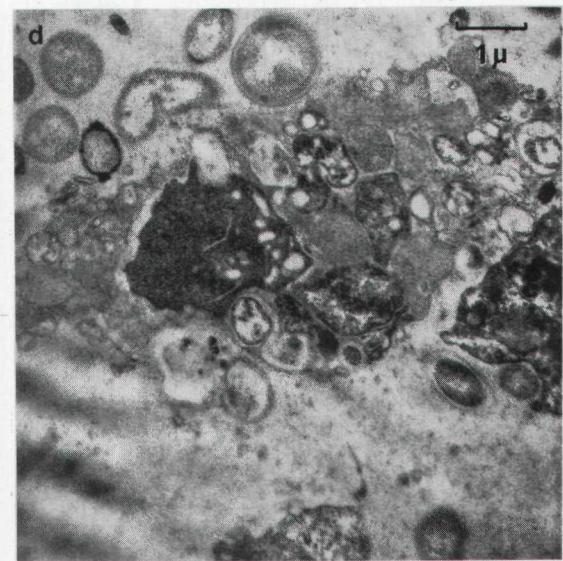
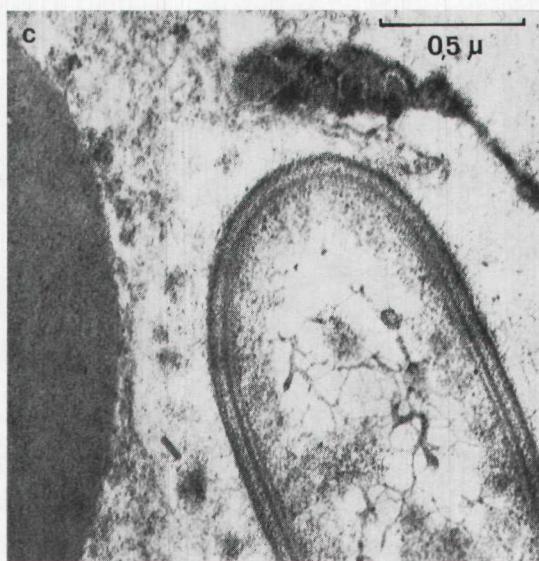
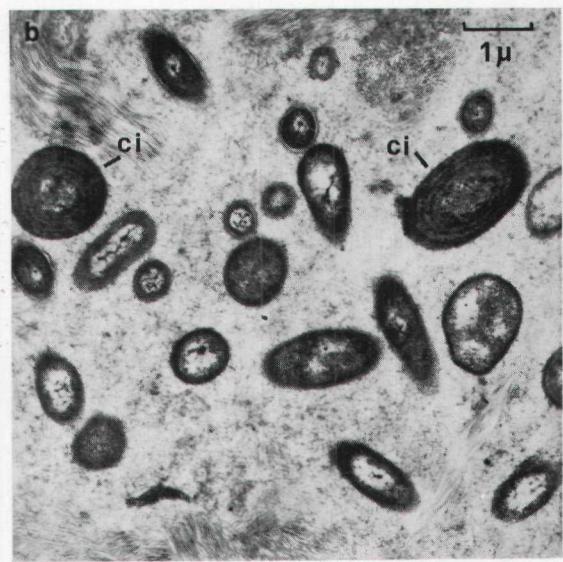
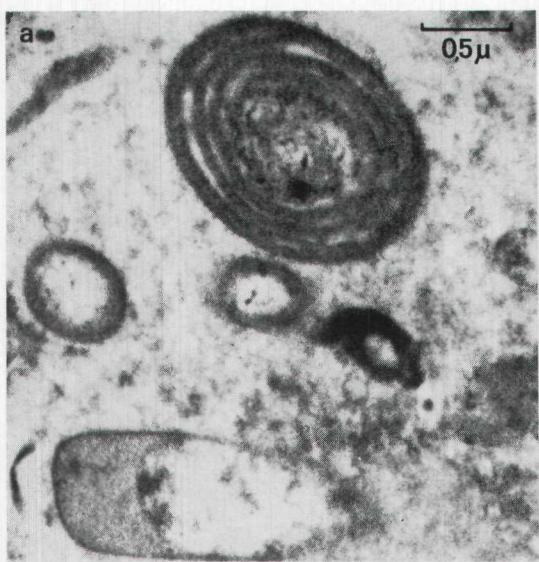
E. GAINO, M. PANSINI e R. PRONZATO

TAVOLA I



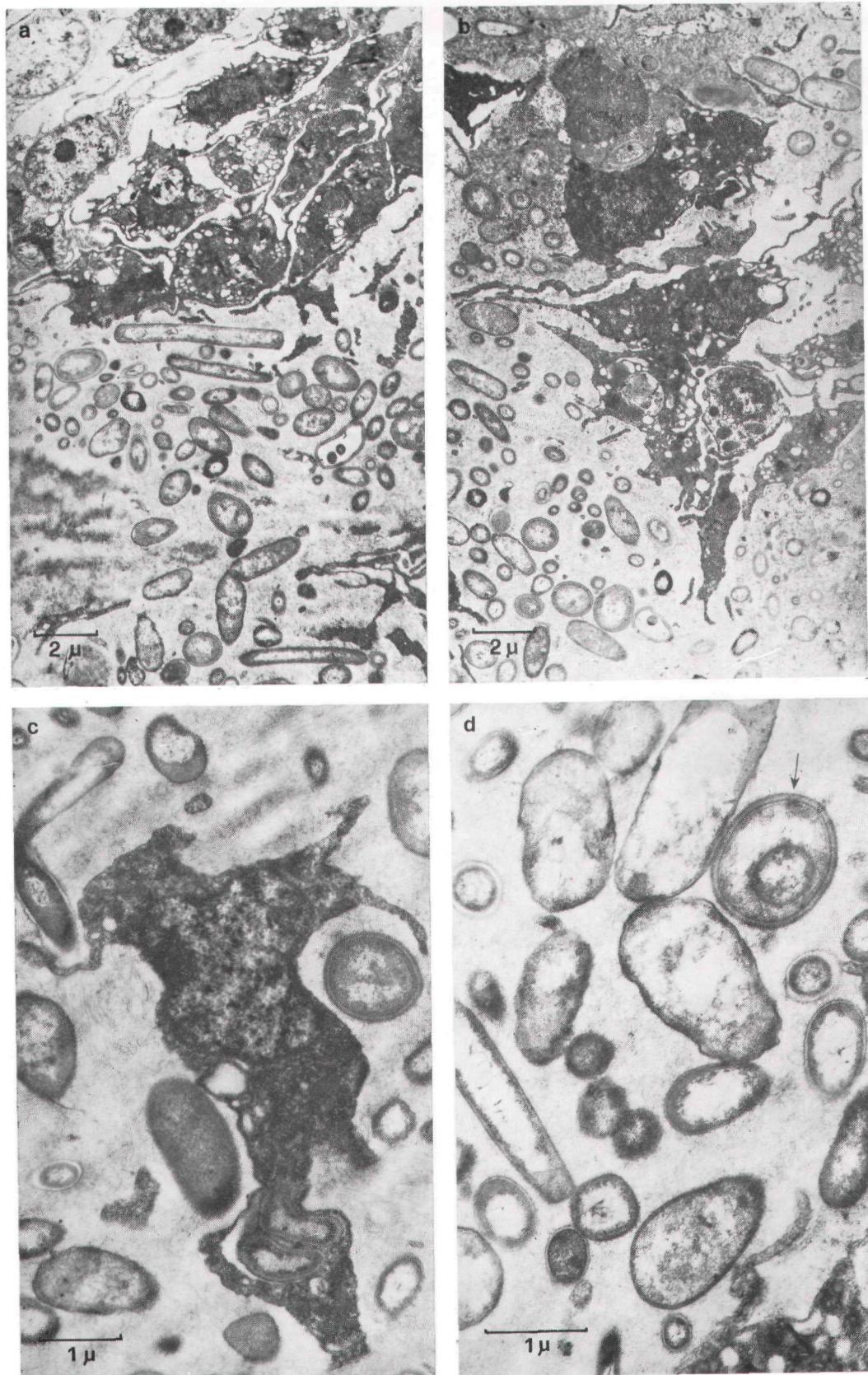
E. GAINO, M. PANSINI e R. PRONZATO

TAVOLA II



E. GAINO, M. PANSINI e R. PRONZATO

TAVOLA III



E. GAINO, M. PANSINI e R. PRONZATO

TAVOLA IV



E. GAINO, M. PANSINI e R. PRONZATO

TAVOLA V