

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS FOTOSINTETICAS EN EL MONIMOLIMNION DEL ESTANY DE CULLERA (VALENCIA)

R. Mondragón, E. Vicente y J.J. Guillenea

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia

Palabras clave: Meromictic coastal lagoons, photosynthetic bacteria, lagoon of Cullera (Spain).

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA FROM THE MONIMOLIMNION OF "THE ESTANY OF CULLERA" (VALENCIA)

The Estany of Cullera is a coastal lagoon with a tendency to stratification. In the year of the study was meromictic, consisting in two distinct waters layers: freshwater of fluvial origin in the surface and marine water in the bottom.

The high contents of sulphide in the anoxic marine water layer, makes possible the growth of important populations of photosynthetic bacteria, that in summer present two density maxima: one in the chemocline and another near the bottom. The dominant organism in these maxima was identified as *Chlorobium phaeovibrioides*. Other phototrophic bacteria have been isolated from these water layers, using enrichment techniques based on the modification of the concentration of sulfide, pH and light intensity and spectra, as well as isolation in solid medium. These bacterial strains were identified in axenic cultures by means of the absorption spectra of their pigments, morphology and ultrastructure as pertaining to the species *Chlorobium limicola*, *Chromatium vinosum* and *Rhodospirillum vannielii*. The presence of *Thiospirillum* sp. was also observed but axenic cultures for its study and identification could not be obtained.

The environmental conditions characteristic of the chemocline of this lagoon determine a notorious and constant dominance of *Chlorobium phaeovibrioides* over all the other photosynthetic bacteria that are always in low number. Only in early summer, an important growth of *Chlorobium limicola* is apparent, and it is possible to observe a green water layer in the chemocline, just above the brown layer of *Chlorobium phaeovibrioides*.

INTRODUCCION

En estuarios cerrados y lagunas litorales con flujo de agua dulce superficial, cuando la profundidad lo permite, se establece con frecuencia una pycnoclina, capaz de separar por una quimioclina estable, una zona monimolimnética donde se agota el oxígeno y un mixolimnion oxigenado.

La presencia de sulfuro de hidrógeno en el monimolimnion de estas lagunas, procedentes mayormente de la reducción de sulfatos, posibilita el desarrollo de grandes poblaciones de bacterias fototrofas del azufre, siempre que dispongan de una intensidad luminosa suficiente en estas zonas anóxicas del lago

(Pfennig, 1967).

Estas bacterias fotosintéticas forman con frecuencia una capa en la quimioclina de los lagos meromicticos, debido entre otras causas al efecto de auto-sombra, pero en ocasiones los fotosintéticos bacterianos se extienden a todo el monimolimnion con densidades variables. En algunos lagos mesotróficos someros se encuentran formando una fina película en contacto con el sedimento (Czeczuga, 1968), mientras que bajo especiales condiciones hidrográficas, particularmente en cuencas pequeñas, las bacterias invaden todo el cuerpo del agua. Esto último puede

observarse en la laguna del Sisó, pequeña charca integrante del sistema cárstico de Banyoles (Guerreiro *et al.*, 1980).

Las bacterias fotosintéticas no sulfúreas (*Rhodospirillaceae*) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y es difícil recoger muestras del fondo o de la masa de agua en las que por métodos de enriquecimiento no se pueda demostrar su presencia (Van Niel, 1944). Sin embargo, no se han encontrado acumulaciones de *Rhodospirillaceae* como las que presentan las bacterias verdes y púrpuras del azufre, a pesar de que con bajas concentraciones de sulfuro algunas especies pueden utilizarlo como dador de electrones (Hansen & van Gernerden, 1972). Las especies de esta familia aisladas de medios marinos, usan el sulfuro y el tiosulfato mucho mejor que las cepas de agua dulce, probablemente como adaptación a la fuerte reducción de sulfatos en los ambientes costeros (Imhoff, 1979).

MATERIAL Y METODOS

El lago: el Estany de Cullera es una laguna litoral meromítica situada en las cercanías de la ciudad de Cullera (Valencia), formada por el cierre de un antiguo estuario fluvial mediante una barra arenosa que delimita en conjunto una cubeta alargada de unos tres kilómetros de longitud y 400 a 500 metros de anchura media. La profundidad máxima es de 7 metros en la zona central y la media de 4 metros. Los aportes fluviales determinan un flujo superficial de agua dulce que discurre sin mezclarse con el agua salada de origen marino que penetra a través de la barra arenosa y que la subyace hasta el fondo de la cubeta. La circulación típica de un estuario positivo que se presenta en esta laguna, determina la presencia constante de una cuña de agua salada más densa que se extiende por el fondo con un espesor de 3'5 a 4'5 metros. Esta cuña salina está separada por una fuerte pycnoclina de agua dulce superficial con la que se mezcla en la zona de contacto formando un gradiente. La presencia de esta pycnoclina impide una mezcla importante de ambos sistemas y determina la formación de una quimioclina que separa la zona profunda y anóxica de la laguna (monimolimnion) de su parte más superficial oxigenada (mixolimnion), con la fuerte variación de los parámetros físico-químicos y biológicos que esta estratificación conlleva (Fig. 1)

Métodos experimentales: Las muestras para el aislamiento de las bacterias fototrofas se han obtenido extrayendo agua de la profundidad adecuada, desde la quimioclina situada aproximadamente a 4'5 metros hasta el fondo (7 metros), y según la precisión requerida se ha utilizado una botella limnológica de Ruttner de 2'6 litros de capacidad o un sistema de bombeo peristáltico semejante al utilizado por Cohén *et al.* (1977) en el Solar Lake, a fin de minimizar la distorsión de las capas bacterianas.

Medios de cultivo.

Para las bacterias verdes y rojas del azufre se usó como base el medio de Pfennig (1965) con algunas modificaciones sugeridas por el Dr. H. van Gernerden (comunicación personal) y cuya composición final es la siguiente: NH_4Cl , 300 mg/l; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/l; KCl, 100 mg/l; vit. B_{12} , 20 μg /l; solución de elementos traza (SL-4) (Pfennig & Lippert, 1966), 10 ml/l; Na_2CO_3 , 2 g/l; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 240-480 mg/l y HCl 1N, 20 ml/l. El pH final se ajustó en un rango de 7 a 8. Por tratarse de bacterias procedentes de ambientes marinos se ha adicionado al medio 20 g/l de NaCl y también, en algunos casos, se ha suplementado con 250 mg/l de acetato sódico como fuente adicional de carbono.

Para las bacterias rojas no sulfúreas se ha utilizado el medio propuesto por Biebl & Pfennig (1981), cuya composición es: NH_4Cl , 300 mg/l; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mg/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/l; NaCl, 200 mg/l; solución de elementos traza (SL-4), 10 ml/l; vit. B_{12} , 20 μg /l; extracto de levadura, 200-300 mg/l; acetato sódico, 1 g/l; pH final de 7,3.

Identificación

Utilizando técnicas de enriquecimiento basadas en la modificación de la concentración de sulfuro, pH e intensidad y tipo de espectro luminoso, así como aislamientos en medio sólido, se han obtenido colonias de diferentes bacterias fototrofas. Los cultivos puros han permitido su identificación siguiendo los criterios propuestos por Pfennig (1971, 1974) Y Mandel *et al.*, (1971), basados principalmente en el estudio del espectro de absorción de sus pigmentos (bacterioclorofilas y carotenos), morfología, tamaño, movilidad y ultraestructura.

El tipo de bacterioclorofila (Bchl.) y carotenos que posee cada especie se determinó mediante el espectro "in vivo" de una suspensión de bacterias y por extracción de los pigmentos con acetona 90%, midiéndose espectrofotométricamente en este extracto las concentraciones de bacterioclorofilas y carotenos presentes (Yentsch, 1967; Gloe *et al.*, 1975).

La morfología y tamaño de las bacterias se han determinado por observación en fresco bajo contraste de fases tanto de las muestras de campo, previamente concentradas por centrifugación, como de los cultivos de laboratorio.

Microscopía electrónica

Para la observación de la ultraestructura, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído en tampón cacodilato (pH=7,2), durante dos horas y postfijadas con tetróxido de osmio (1%) durante una noche a 4°C. Tras ser deshidratadas con etanol y teñidas con acetato de uranilo, las muestras se incluyeron en araldita (Fluka). Los cortes obtenidos se contrastaron finalmente con citrato de plomo. Para la observación por tinción negativa, las muestras fueron depositadas sobre una rejilla recubierta de formvar y tratadas directamente con ácido fosfotúngstico 1% durante dos minutos.

Parámetros físico-químicos y biológicos

La temperatura y salinidad se determinaron con ayuda de un salinómetro de campo (Yellow Spring Inst. USA, modelo 33), y el pH y el potencial de óxido-reducción mediante un medidor portátil (Radiometer 80), expresándose los valores obtenidos como sus correspondientes para la temperatura de 25°C. Para la determinación del O₂ disuelto se empleó el método de Winkler. La determinación del sulfuro se realizó por el método del azul de metileno, tras su precipitación en las muestras de agua con acetato de zinc (220 g/l) y NaOH 1N, (Trüper & Schlegel, 1964). El número total de bacterias se determinó mediante recuento microscópico directo y la concentración de bacterias fotótrofas viables por diluciones seriadas en medio sólido contenido en tubos con tapón de rosca completamente llenos.

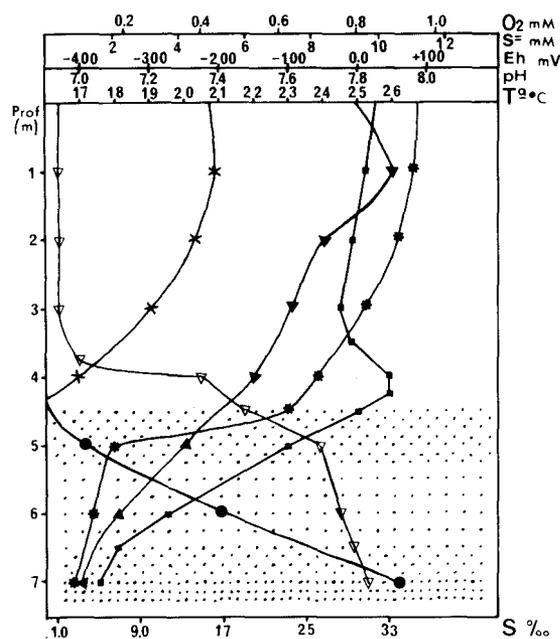


Fig. 1 - Distribución vertical de algunos parámetros físico-químicos y su relación con las capas bacterianas en el Estany de Cullera, el día (24-8-82). El punteado muestra la distribución de las bacterias fotosintéticas. ● Temperatura; ▽ Salinidad; ▲ pH; * Eh; X Oxígeno; ● Sulfuro - Vertical profiles of some physico-chemical parameters in relation to the bacterial plates in the "Estany de Cullera" in August 24th., 1982. The shaded area shows the distribution of photosynthetic bacteria. ■ Temperature; ▽ Salinity; ▲ pH; * Eh; X Oxygen; ● Sulphide

RESULTADOS

La distribución vertical de los parámetros físico-químicos en el lago nos permite situar la quimioclina alrededor de los 4,5 m (Fig. 1), pudiendo observarse cómo en esta zona se agota el oxígeno y aparece el sulfuro al tiempo que se produce un cambio brusco en el potencial de Oxido-reducción, que pasa de oxidante a fuertemente reductor. Precisamente en esta quimioclina es donde aparecen las bacterias fotótrofas, cuya distribución en el perfil del rnomolimnion viene reflejada en la tabla 1.

La figura 2 muestra los espectros de absorción de muestras de agua del lago tomadas a distintas profundidades con fecha de 24-8-82. Se observa cómo la especie predominante es *Chlorobium phaeovibrioides*, especie de color pardo que

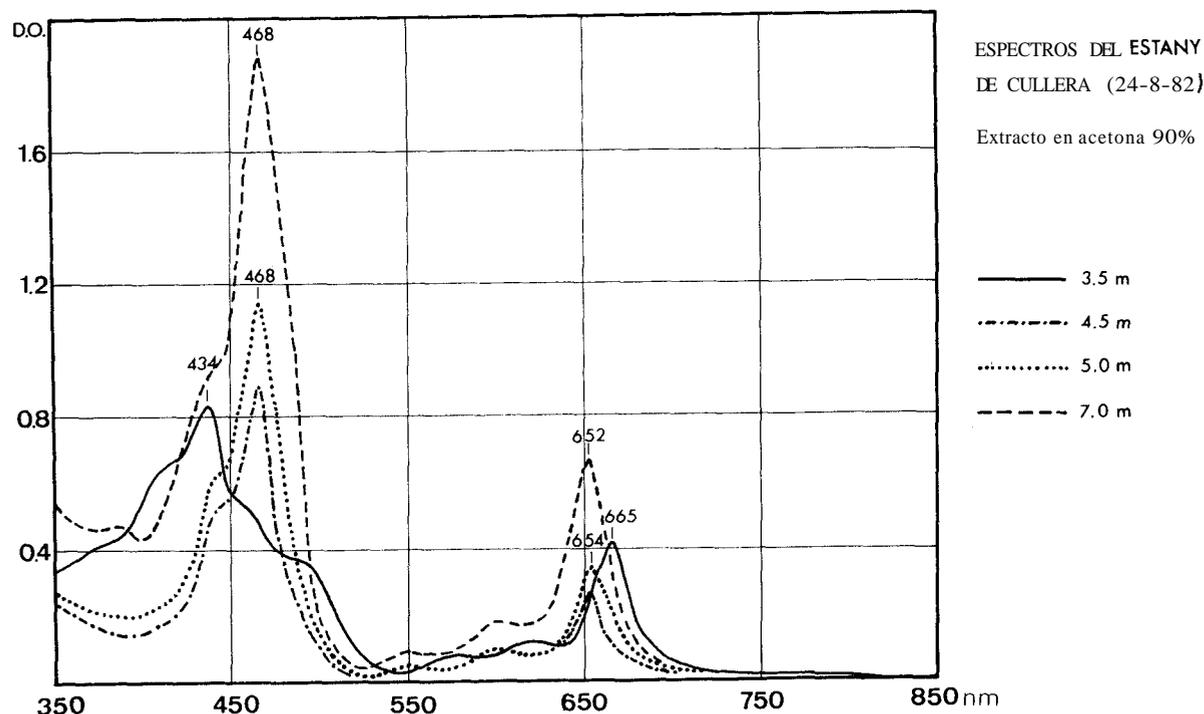


Figura 2.- Espectros de absorción de extractos acethnicos de los pigmentos de muestras de agua de diferentes profundidades. Absortion spectra of the acetonic pigment extracts from samples of different dephs.

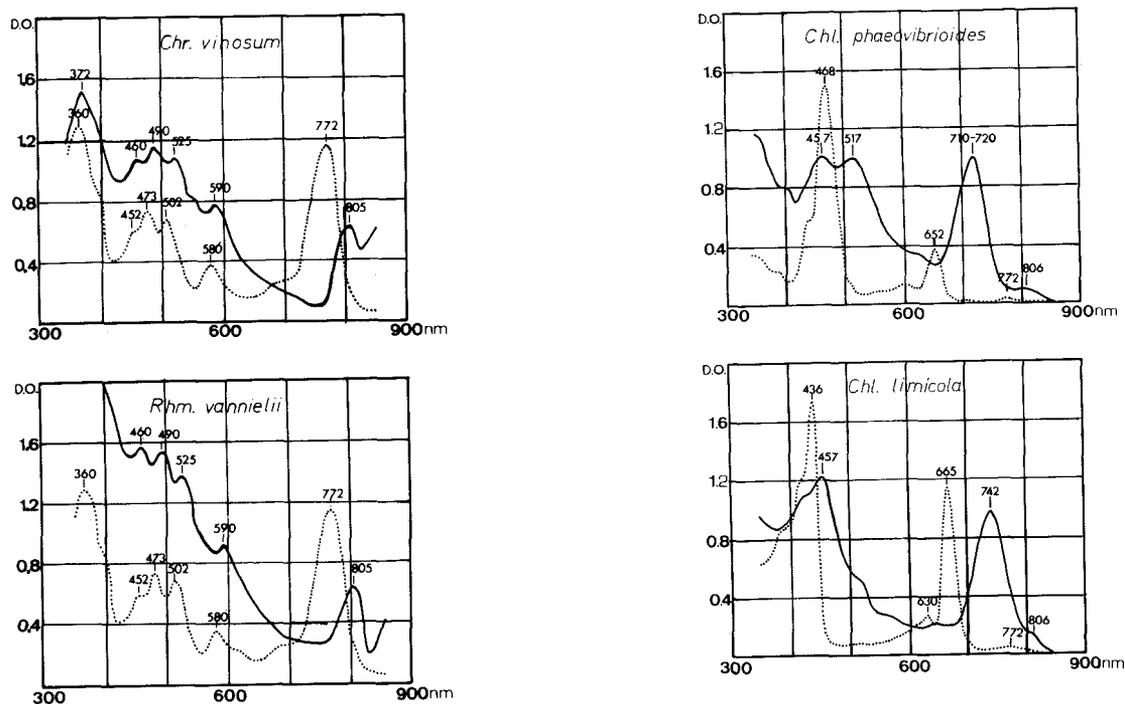
predomina a lo largo de todo el año. Cabe destacar la variación que existe en el contenido de Bchl.e por célula, que aumenta con la profundidad debido al efecto de autosombra y por la necesidad de aprovechar al máximo la energía luminosa disponible.

Se han identificado cuatro especies de bacterias fototrofas, dos pertenecientes a la familia *Chlorobiaceae*: *Chlorobium phaeovibrioides* y *Chlorobium limicola*; una *Chromatiaceae*: *Chromatium vinosum*; y una *Rhodospirillaceae*: *Rhodomicrobium vannielli*.

La identificación de *C. phaeovibrioides* se ha efectuado a partir de su espectro de absorción (Fig. 3), que muestra la existencia de Bchl.e e isorenierateno (caroteno típico de este grupo). También se ha atendido a su forma y tamaño y al estudio de su ultraestructura, que muestra la existencia de clorosomas o vesículas de *Chlorobium* dispuestos en la periferia de la célula por debajo de la membrana citoplasmática (Fig. 4).

El aislamiento de *C. limicola* no resulta fácil, ya que esta especie se encuentra generalmente desplazada por *C. phaeovibrioides*, excepto en una determinada época del año (aproximadamente en el mes de Julio). En esta época la disminución de la biomasa algal en el mixolimnion permite la penetración de la energía luminosa en zonas de espectro aptas para el desarrollo de este clorobium verde, que se sitúa en la parte superior del monímolimnion y por encima de la especie marrón. Los espectros de absorción, tanto de las suspensiones de células como de sus extractos acetónicos se muestran en la figura 3.

El aislamiento de *Chromatium vinosum* presenta ciertas peculiaridades, dado que su presencia en el lago es mínima. Sembrando en un medio de cultivo apropiado agua de diferentes profundidades y con la ayuda de filtros que sólo permitían el paso de radiaciones del espectro rojo lejano e infrarrojo (el espectro de luz transmitida por el filtro presenta un máximo absoluto de 520 nm. y un máximo relativo a



Longitudes de onda de los máximos característicos (nm)
Characteristic absorption maxima (nm)

| | Espectro "in vivo" "In vivo" spectrum | Espectro del extracto acetónico Spectrum of the acetonic extract |
|--------------------|--|---|
| Bchl. a | 805, 590 | 772, 580 |
| Bchl. c | 742 | 665 |
| Bchl. e | 710-720 | 652 |
| Cloro bacte ne | 457 | 436 |
| Isorenieratene | 517 | 468 |
| Lycopene, Rhodopin | 525, 490, 460 | 502, 473, 452 |

Figura 3.- Espectros de absorción de las diferentes bacterias fotótrofas aisladas de la quimioclina del "Estany de Cullera".
Absortion spectra of the different phototrophic bacteria isolated from the chemocline of the "Estany of Cullera"

Tabla 1- Distribución vertical de diversos parámetros biológicos en el monimolimnion del "Estany de Cullera"
CFU: unidades formadoras de colonias de *Chlorobium phaeovibrioides*. El isorenierateno se expresa en unidades arbitrarias (U.A.).
Vertical distribution of different biological parameters in the monimolimnion of the "Estany of Cullera"
CFU: Colony Forming Units of *Chlorobium phaeovibrioides*. The isorenieratene is expressed as arbitrary units (U.A.).

| PROFUNDIDAD | CFU/litro | μg Bchl. e/litro | μg Bchl. e/CFU | U.A. Isorenierateno/Litro |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 4.5 m | $0.4 - 0.6 \times 10^8$ | 15.85 | 31.7×10^{-8} | 3.9 |
| 5.0 m | $0.3 - 0.5 \times 10^8$ | 22.15 | 55.3×10^{-8} | 8.2 |
| 6.0 m | $0.8 - 1.0 \times 10^8$ | 54.10 | 60.1×10^{-8} | 17.5 |
| 7.0 m | $1.0 - 1.2 \times 10^8$ | 97.20 | 88.3×10^{-8} | 33.8 |

Tabla II.- Resumen de las principales características sistemáticas de las bacterias fotosintéticas aisladas del "Estany de Cullera". IRT: isorenierato, CHL; clorobacteno, LY: lipoceno, RH: rodepeno.

Summary of the main systematic characteristics of the photosynthetic bacteria isolated from the "Estany of Cullera". IRT: Isorenieratene, CHL: Chlorobactene, LY: Lycopene, RH: Rhodopin.

| ORGANISMO | Color de la células en suspensión | Forma y tamaño celular | Agregados | Bchl. | Carotenos | Aparato Fotosintético |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------|-----------|-----------------------|
| <i>Chlorobium phaeovibrioides</i> | MARRON | VIBRION 0.3-0.4 x 0.7-1.4 nm | ESPIRALES | e | IRT | CLOROSOMAS |
| <i>Chlorobium limicola</i> | VERDE | BACILO 0.7-1.1 x 0.9-1.5 nm | CADENAS | c | CHL | CLOROSOMAS |
| <i>Chromatium vinosum</i> | MARRON-VERDE | BACILO 2.0 x 2.5-6 nm | NO | a | LY, RH | VESICULAR |
| <i>Rhodomicrobium vannielli</i> | MARRON-NARANJA | OVOIDE 1.0-1.2 x 2.0-2.8 nm | AGREG. POR GEMACION | a | LY, RH | LAMELAR |

690 nm, permitiendo el paso de longitudes de onda superiores a 800 nm), se han podido aislar selectivamente colonias de *C. vinosum*. Otros factores de selección fueron una más baja concentración de sulfuro (2 mM) y un elevado rango de pH (8,0-8,5). La identificación se basó de igual manera en su espectro de absorción (Fig. 3) y en su ultraestructura (Fig. 5).

Por último, utilizando el medio descrito para las *Rhodospirillaceae*, se obtuvieron colonias rojas que se identificaron posteriormente como *Rhodomicrobium vannielli* (Fig. 3, 6 y 7).

competencia entre *Chromatium* y *Chlorobium* se resuelve en un equilibrio desigual en el que ninguna de las especies es eliminada totalmente,

Por último, el hecho de que *Rhodomicrobium vannielli* se aisle en medio no salino, presentando además dificultades para crecer en medio con similar salinidad a la del agua profunda del lago, connotaría su escasa importancia como posible colonizador de estos hábitats, a pesar de la capacidad que presenta esta especie para utilizar el sulfuro como dador de electrones (Hansen, 1974).

DISCUSION

Las condiciones naturales específicas que se presentan en el monimolimnion de esta laguna (concentración de sulfuro, intensidad de luz, espectro luminosos, pH, etc.), determinan un notorio y constante predominio de *C. phaeovibrioides* frente a las restantes bacterias fotosintéticas que sólo se encuentran en bajo número. Entre los dos clorobiums se establece una competencia que se decanta a favor de una u otra especie según el espectro de luz que penetra hasta la capa de agua sulfhídrica, y que a su vez, se ve condicionado por la densidad algal existente en las zonas más superficiales del perfil vertical o por la presencia de una capa de *Chromatium* en un nivel superior (Montesinos *et al.*, 1983). Aproximadamente en el mes de Julio dicha competencia se resuelve en una mayor presencia de *Chlorobium limicola*. Del mismo modo la

BIBLIOGRAFIA

- Biébl, H. & Pfennig, N. 1981. Isolation of members of the f. Rhodospirillaceae. In The Prokaryotes (Starr *et al.* eds) pags. 267-273. Springer-Verlag. Berlin.
- Cohen, Y; Krumbein, W.E. & Shilo, M. 1977 Solar Lake (Sinaí), Limnol Oceanogr. 22: 69-620.
- Czeczuga, B. 1968 Primary production of the sulfuric bacteria Thiopedia rosea Winogr. (Thiorhodaceae). Photosynthetica 2: 161-166
- Gloe, A.; Pfennig, N.; Brokman, H & Trowitzsch, W, 1975 A new bacteriochlorophyll from brown-colored Chlorobiaceae. Arch. Microbiol. 102: 103-109
- Guerrero, R.; Montesinos, E.; Esteve, I. & Abella, C. (1980) Physiological adaptation and growth of purple and green sulfur bacteria in a meromictic lake (Vila) as compared to a holomictic lake (Sisó). Develop. Hydrobiol. 3: 161-171.
- Montesinos, E.; Guerrero, R.; Abella, C. & Esteve I. 1983 Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeovibrioides* in natural habitats. App. Environ. Microbiol. 46: 1007-1016
- Hansen, T.A. 1974 Sulfide als electronendonor voor



Figura 4.- Sección ultrafina de *Chlorobium phaeovibrioides* mostrando los clorosomas (CL). - Ultrastructure of *Chlorobium phaeovibrioides* showing the chlorosomes (CL).

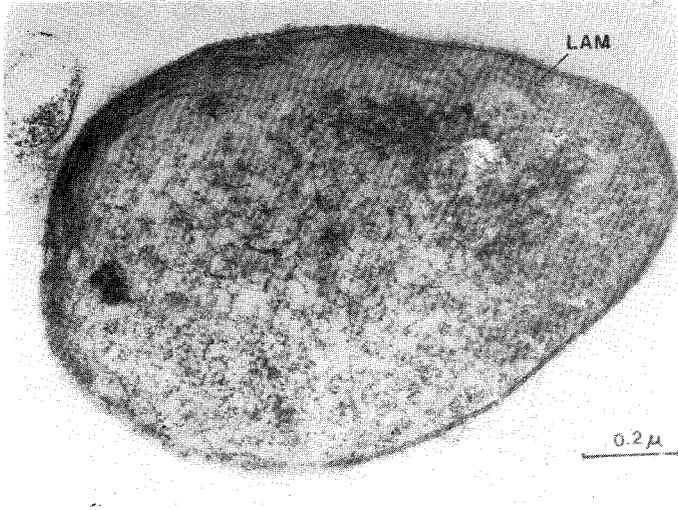


Figura 6.- Sección ultrafina de *Rhodomicrobium rannielli* mostrando el sistema lamelar de los cromatóforos (LAM) - Ultrastructure of *Rhodomicrobium rannielli* showing the lamellar system of the chromatophores (LAM)

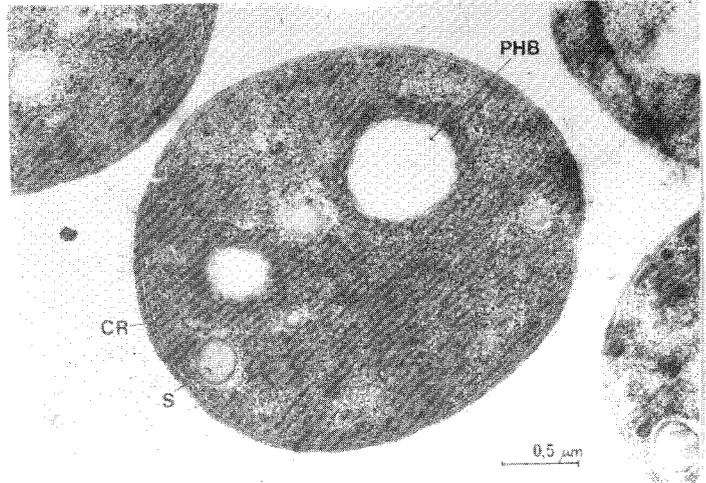


Figura 5.- Sección ultrafina de *Chromatium vinosum* mostrando los cromatóforos (CR), los gránulos de PHB y glóbulos de azufre (S). Section of *Chromatium vinosum* showing the chromatophores (CR), PHB inclusions and sulphur globules.

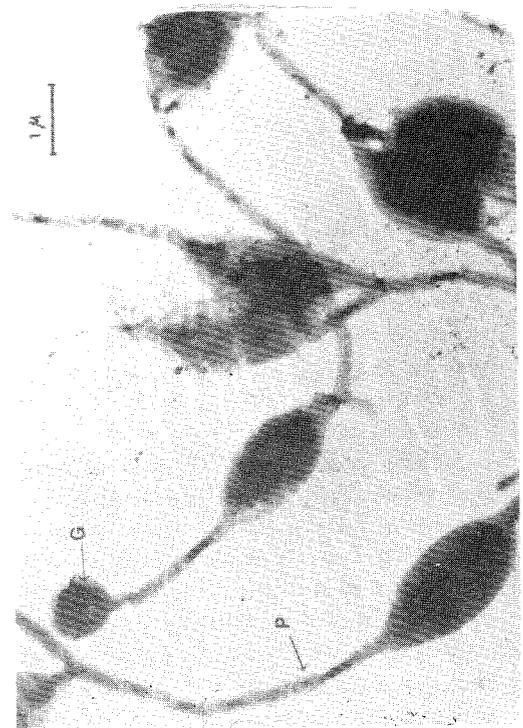


Figura 7.- Micrografía electrónica de *Rhodomicrobium rannielli* (tinción negativa PTA 1%) mostrando las prostecas (P) y las yemas (G) - Electronic micrograph of *Rhodomicrobium rannielli* (negative stain PTA 1%) showing prosthecae (P) and buds (G)

Rhodospirillaceae. Doctoral Thesis University of Groningen.

Mandel, M.; Leadbetter, E.R.; Pfennig, N. & Truper, H.G. 1971 Deoxyribonucleic acid base composition of phototrophic bacteria Int J. Syst. Bacterio. 21: 222-230

Pfennig, N. 1965 Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. 1 Suppl. 1: 179-189

Pfennig, N. & Lippert, K.D. 1966 Über das Vitamin B12 Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien Arch. Microbiol. 55: 245-256

Pfennig, N. & Truper, H.G. 1971a New nomenclatural combinations in the phototrophic sulfur bacteria Int. J. Syst. Bacteriol. 21:11

Pfennig, N. & Truper, H.G. 1971b Conservation of the family name Chromatiaceae Bavendamm 1924 with the type genus Chromatium Perty 1852, request for an opinion Int. J. Syst. Bacterio. 21: 15

Pfennig, N. & Truper, H.G. 1974 The phototrophic bacteria. IN Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan & Gibbon eds.): 24-64. Williams & Wilkins. Baltimore

Pfennig, N. & Truper, H.G. 1964 Sulphur metabolism in

Thiorhodaceae. I. Quantitative measurements on growing cells of Chromatium okenii. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 30:225-238

Pfennig, N. & Truper, H.G. 1981 Isolation of members of the f. Chromatiaceae and Chlorobiaceae, In The Prokaryotes (Starr *et al.* eds.) pages. 279-289. Springer-Verlag. Berlin.

van Niel, C.B. 1944 The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. Bacteriol Rev. 8: 1-118

Yentsch, C., 1967 The measurements of chloroplastic pigments. Thirty years of progress? In Chemical environment in the aquatic habitat. (Golterman & Clymo eds.) N.V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij. Amsterdam.