

EFECTO DE LA INTENSIDAD Y CALIDAD DE LUZ EN EL DESARROLLO DE POBLACIONES DE BACTERIAS FOTOTRÓFICAS VERDES DEL AZUFRE EN UNA COLUMNA EXPERIMENTAL DE LABORATORIO

I.V. Pibernat y C.A. Abella

Instituto de Ecología Acuática y Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad de Girona. Pl. Hospital, 6, E-17071 GIRONA.

Keywords: competence, actinic light filter, *Chlorobium limicola*, *C. phaeobacteroides*, ecophysiology.

ABSTRACT

EFFECT OF LIGHT QUALITY AND INTENSITY ON THE GROWTH OF GREEN SULFUR BACTERIA IN AN EXPERIMENTAL COLUMN

This study was made using two experimental semicolumns of 130 cm long. One semicolumn was used as control and the other with an actinic light filter. Both semicolumns were equipped with a temperature control of water and a system to introduce sulphide in the bottom layers of the water column. Hence the laboratory column represents an ecosystem similar to the water column of many lakes, and allows the study of competence between *C. limicola* and *C. phaeobacteroides*, species of Green Sulphur-bacteria in relation to controlled light conditions.

The main difference between both semicolumns was the incident light. Every one were illuminated from above using a lamp of 40 W with an incident radiation of $30.3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The other semicolumn had an actinic light filter of 1 M CuSO_4 between the lamp and the water column. The initial radiation measured was $5.1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

The quality and intensity of light from both columns determine the differential growth of Green Sulphur bacterial populations. The light intensity could determine the high concentration of photosynthetic pigments in the control semicolumn ($550 \mu\text{g/l}$ Bchl-*c* and *e*) in relation to $325 \mu\text{g/l}$ Bchl-*c* and *e* measured in the semicolumn with actinic filter. In the column with actinic filter the brown population of *C. phaeobacteroides* was enriched 10 cm above in the water column (90 cm depth) than the control semicolumn where the plate of bacterial population was situated at 100 cm depth showing the effect of higher light intensity.

INTRODUCCIÓN

La luz es la fuente de energía para las bacterias fototróficas del azufre. La intensidad de luz determina el número de fotones que llegan a una determinada profundidad en una columna de agua; mientras que la calidad de luz depende del espectro de luz. Es la calidad de luz quien condiciona la energía de los fotones y facilita la excitación de las moléculas de bacterioclorofila y pigmentos accesorios de la fotosíntesis (KIRK, 1979). La radiación solar y la iluminación presente en determinadas capas anaeróbicas de lagos ha sido relacionada con la presencia de las bacterias fototróficas del azufre (ABELLA, 1982; VILA, 1992). La concentración de poblaciones de bacterias fototróficas del azufre depende de la concentración de sulfhídrico en

condiciones no limitantes de luz (VAN GEMERDEN, 1981, 1987).

En este estudio se cuantifica la importancia de la iluminación en el desarrollo de poblaciones de Clorobiáceas, *Chlorobium limicola* y *C. phaeobacteroides* en una columna experimental de laboratorio. Se focaliza en el estudio de: (1) -el efecto de la calidad y intensidad de la luz en relación a la competencia entre poblaciones de *Chlorobium limicola* y *C. phaeobacteroides* y (2) -determinar el efecto ecofisiológico producido por diferencias de iluminación en las poblaciones de bacterias verdes del azufre.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado en una columna de laborato-

rio de 130 cm de largo por 11 de diámetro dividida en dos mitades. Esta columna experimental ha sido descrita previamente por PIBERNAT *et al.* (1992), pero ha sido modificada con la finalidad de obtener dos semicolumnas. La iluminación se ha realizado con una bombilla de 40 W situada 25 cm por encima de la columna. A una mitad de la columna se ha colocado un filtro actínico de CuSO_4 (1M) mientras que la otra mitad ha sido utilizada como control. Ambas semicolumnas fueron llenadas con medio de cultivo Pfennig (pH 6,7) para bacterias fototróficas y se ha inoculado un volumen determinado de una mezcla al 50% entre cultivos de *C. limicola* y *C. phaeobacteroides* al inicio del estudio (Fig 1).

El espectro de luz de la bombilla de 40 W utilizada para este estudio (Fig 2) manifiesta un enriquecimiento en la

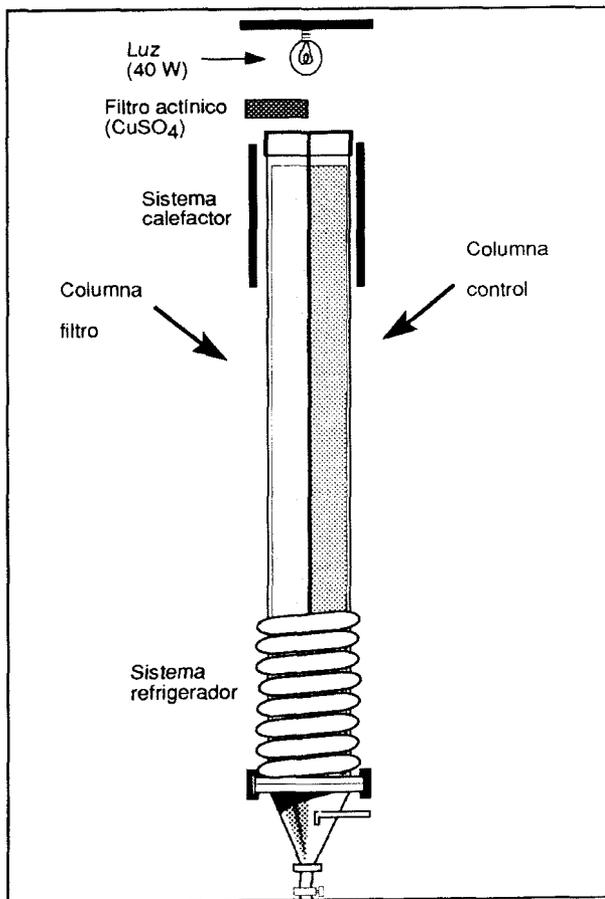


FIGURA 1.- Esquema de las semicolumnas utilizadas para el presente estudio. Se divide la columna en dos mitades para poder disponer de una de control.

FIGURE 1.- Schematic representation of the experimental column used in this work.

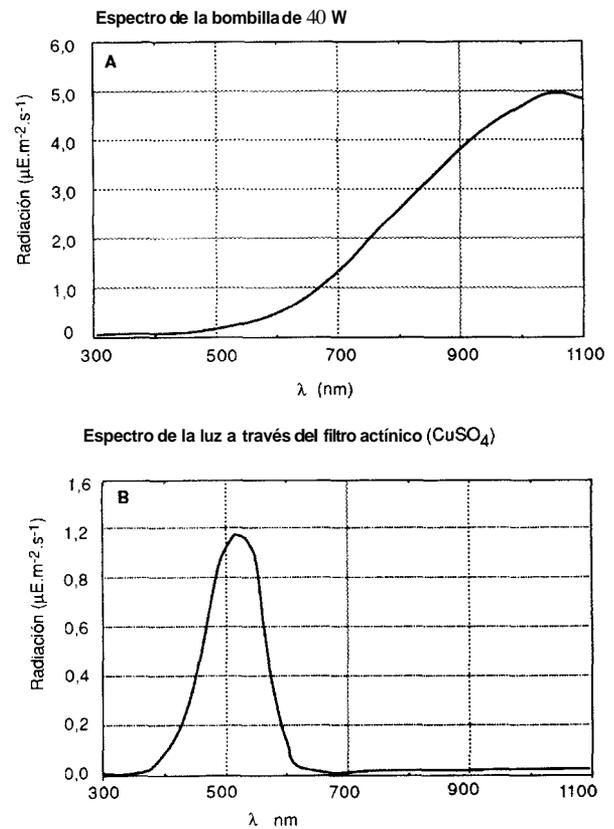


FIGURA 2.- Representación de los espectros medidos en la bombilla de 40 W (A), iluminación que recibía la columna control y la columna con filtro actínico de luz (B).

FIGURE 2.- Spectral distribution of light in both semicolumns used in this work.

banda del infrarrojo, de 500 a 1100 nm. El PAR inicialmente medido es $30,3 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con una intensidad de luz de 817 lux. El filtro actínico presenta un espectro más estrecho que comprende longitudes de onda entre 450 y 600 nm. El PAR inicial medido es de $5,1 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la intensidad de luz de 88,7 lux.

La temperatura y conductividad del agua han sido medidas con un termómetro T-637 y conductímetro 523 Crison8 respectivamente. La intensidad de luz ha sido medida utilizando un luxómetro Megatron. La concentración de sulfhídrico se ha medido utilizando el método del azul de metileno (PACHMAYER, 1960). El pH fue medido con pHmeter Crison® 506 y el potencial de óxido-reducción con un electrodo de Pt Metrom 6.0401.100. Los pigmentos fotosintéticos y la concentración de azufre (S^{2-}) han sido cuantificados utilizando el método descrito por MONTE-SINOS (1982).

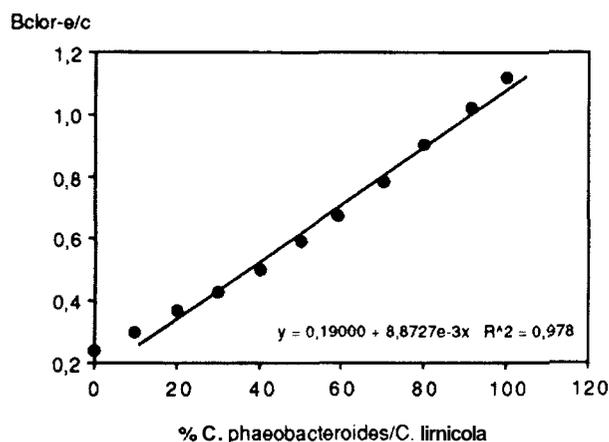


FIGURA 3.- Relación entre el porcentaje relativo entre *C. phaeobacteroides* y *C. limicola* con la relación entre la concentración de bacterio-clorofila *e/c*.

FIGURE 3.- Relation between percentage of *C. phaeobacteroides* and *C. limicola* and Bchl *elc* concentration.

Para calcular el porcentaje entre poblaciones de *Chlorobium limicola* y *C. phaeobacteroides* en la columna se ha realizado una recta de calibración con cultivos de laboratorio. En la Fig 3 se representa la recta de calibración obtenida a partir de la relación entre concentraciones de pigmento fotosintéticos al mezclar ambas poblaciones.

La relación utilizada se basa en la concentración de los pigmentos fotosintéticos de ambas poblaciones, bacterio-clorofila-*e* y *c* con un r^2 de 0,9789,:

Conc. Bchl-*e*/Bchl-*c* = 0,190-0,009 (% *C. phaeobacteroides*)

% *C. limicola* = 100 - (% *C. phaeobacteroides*)

RESULTADOS

Los dos parámetros que determinan la presencia y concentración de poblaciones de bacterias fototróficas del azufre en condiciones naturales son la calidad e intensidad de luz y la concentración de sulfhídrico. En este estudio se pretende determinar el efecto de la iluminación por lo que se han mantenido constantes los niveles de H_2S en ambas semicolumnas. La concentración de sulfhídrico se representa en la Fig 4. La máxima concentración de H_2S medida es de $750 \mu M$.

El desarrollo de las poblaciones de bacterias fototróficas del azufre se ha medido en base a las concentraciones de pigmentos fotosintéticos, Bchl-*e* y isorenierateno para determinar presencia de *C. phaeobacteroides*; y Bchl-*e* y clorobacteno para *C. limicola*. En la Fig. 5 se repre-

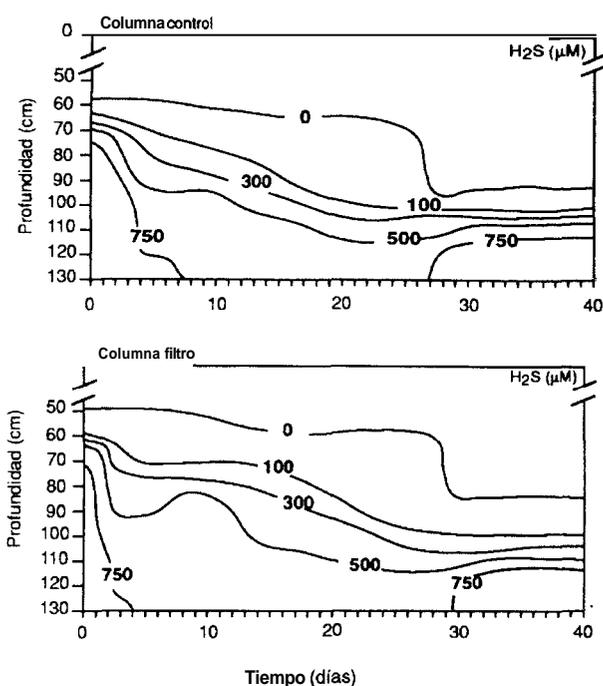


FIGURA 4.- Representación espacio-temporal de la concentración de sulfhídrico medido en ambas semicolumnas (columna filtro y columna control) a lo largo del estudio. No se observan diferencias importantes para determinar un crecimiento diferencial de las poblaciones de Clorobáceas.

FIGURE 4.- Time course of sulfide concentration in both semicolumns.

senta la relación espacio-temporal de la concentración de pigmentos fotosintéticos en ambas columnas.

La Bchl-*e* se representa en las Figuras 5a y 5b indicando la concentración de *C. phaeobacteroides* en la semicolumna control y en la semicolumna con filtro. Se manifiesta una disminución a lo largo de todo el estudio en la semicolumna control con plate entre 85 y 110 cm de profundidad. La máxima concentración se presenta al inicio del estudio con $150 \mu g/l$. En la semicolumna con filtro de luz (Fig 5b) se observa un enriquecimiento de Bchl-*e* entre los 80 y 100 cm de profundidad con máximo analizado al final del estudio de $125 \mu g/l$.

En la Fig. 5c y 5d se representa la relación espacio-temporal de la concentración de Bchl-*c* en las semicolumnas, filtro y control. La concentración de *C. limicola* presenta una alta concentración ($400 \mu g/l$) al inicio del estudio entre los 70 y 100 cm de profundidad en la semicolumna control. Finalmente, se estabiliza la población en los $150 \mu g/l$ de Bchl-*c*.

En la semicolumna filtro, la concentración de *C. limicola* se localiza entre los 80 y 90 cm de profundidad con va-

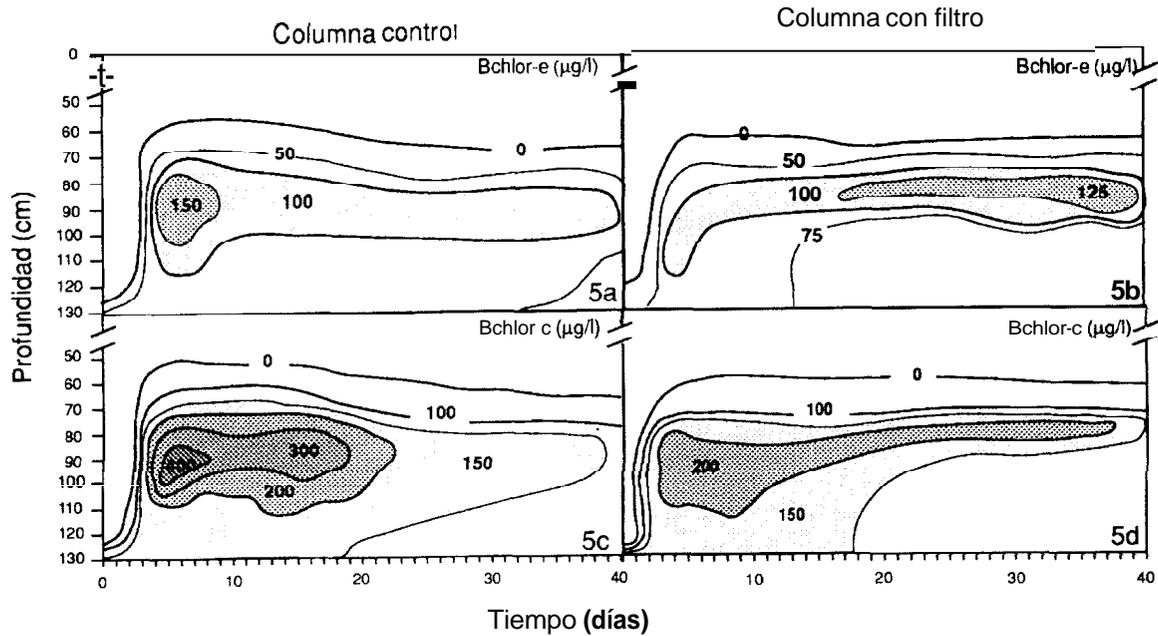


FIGURA 5.- Representación espacio-temporal de la concentración de pigmentos fotosintéticos, Bchlor-e representa a *C. phaeobacteroides* y Bchlor-c a *C. limicola*. Fig. 5a y 5c representan el comportamiento de ambas poblaciones en la columna de control, mientras que las representaciones 5b y 5d pertenecen a la columna con filtro actínico.

FIGURE 5.- Time-depth distribution of bacteriochlorophyll concentration in both semicolumns.

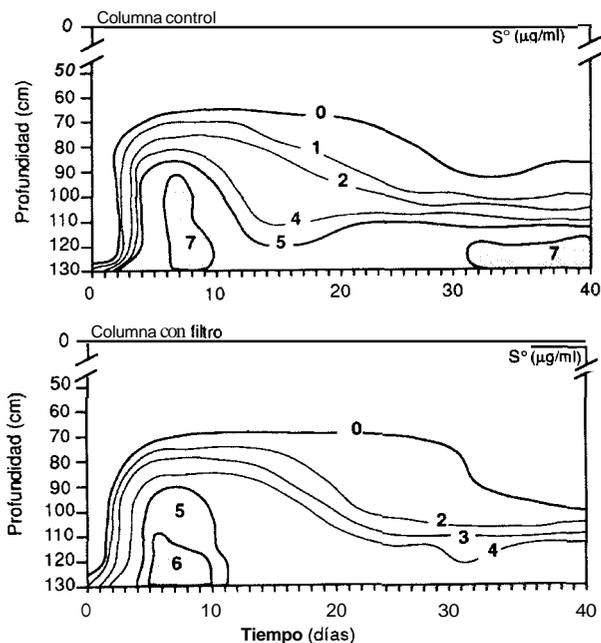


FIGURA 6.- Representación espacio-temporal de la concentración de azufre elemental (S^0) medido en ambas semicolumnas, la control (superior) y la con filtro actínico (inferior). Se observa una mayor concentración de azufre elemental en la columna control a lo largo de todo el estudio.

FIGURE 6.- Time course representation of elemental sulfur (S^0) concentration measured in column-control (upper) and column with actinic filter (bottom par).

lores de $200 \mu\text{g/l}$ de Bchlor-c. El *plate* en esta columna se estrecha en una zona comprendida entre los 70 y los 85 cm de profundidad.

En la Fig. 6 se representa la relación espacio-temporal de la concentración de S^0 en las columnas control y filtro. En la columna control, la máxima concentración medida es de $7 \mu\text{g/ml}$ de S^0 localizada en el fondo de la columna al inicio del estudio, mientras que en la columna con filtro, los valores obtenidos son inferiores, el máximo es de $6 \mu\text{g/ml}$. El S^0 producido por la fotosíntesis de estas poblaciones y por la oxidación química del sulfhídrico, sedimenta al fondo de la columna al no haber ningún sistema de agitación.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, la iluminación se caracteriza por un enriquecimiento en la banda del infrarrojo del espectro de emisión siendo esta luz rápidamente absorbida por la columna de agua. Esta característica obliga a las poblaciones de bacterias fotosintéticas del azufre a captar la luz a través de los sistemas de carotenos. La absorbancia *in vivo* de la bacterioclorofila-c está en los 745 nm, mientras que la Bchlor-e está alrededor de los 725 nm fuera del límite

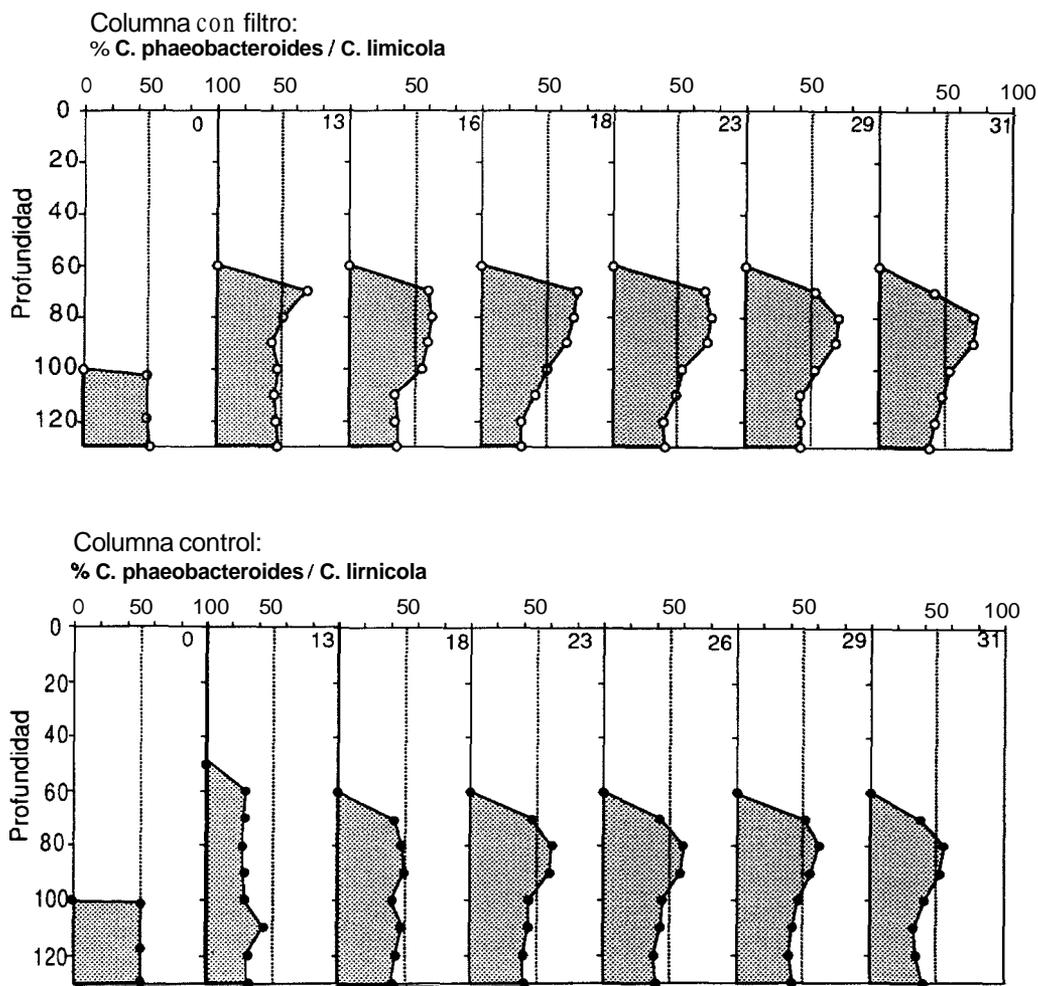


FIGURA 7.- Representación espacio-temporal del porcentaje relativo de la población de *C. phaeobacteroides* (zona tramada) en relación a *C. limicola* en las semicolumnas control y con filtro actínico. Se observa que en la columna control, el porcentaje se mantiene alrededor del 50% entre ambas poblaciones, mientras que en la columna con filtro se manifiesta un enriquecimiento de la población de *C. phaeobacteroides*.
 FIGURE 7.- Time-depth representation of *C. phaeobacteroides* percentage in the mixed population in both semicolumns. In the column with actinic filter the percentage increases in relation to control.

del espectro de luz que deja pasar el filtro actínico.

La intensidad de luz en la columna control es un 20 % superior lo cual permite el crecimiento en competencia por el sulfhídrico de las dos poblaciones, así se mantienen en un porcentaje del 50% las dos.

En la Fig. 7 se representa el porcentaje de la población de *C. phaeobacteroides* y *C. limicola* a lo largo del estudio en ambas semicolumnas experimentales. Estos resultados han sido obtenidos, previa calibración con cultivos de laboratorio, en base a la recta de calibración (ver Material y Métodos) utilizando los pigmentos fotosintéticos. El máximo porcentaje de la población de *C. phaeobacteroides*

es 67,7 % en la columna con filtro localizado a los 77 cm de profundidad. En la columna control se mantiene en un 50,2 % de *C. phaeobacteroides* con máximo localizado a los 100 cm de profundidad.

Los resultados obtenidos indicarían que la reducción en el espectro de emisión en la columna con filtro actínico favorece el crecimiento de la población marrón, *C. phaeobacteroides* frente a la población verde de *C. limicola*. El máximo de absorbancia del isorenierateno, *C. phaeobacteroides* (473-524 nm) se encuentra en la zona media del espectro de luz que atraviesa el filtro actínico, mientras que el máximo de concentración del clorobacteno (*C. limicola*,

TABLA 1.- Resumen de las características estudiadas entre la columna control y la columna con filtro de luz en relación al desarrollo de Clorobiáceas.
 TABLE 1.- Summary of the characters studied in both columns (control and with actinic filter) in relation to growth of green sulfur bacteria.

Características	Filtro	Control
Porcentaje medio población <i>C. phaeobacteroides</i> (%)	67,7	50,2
Porcentaje medio población <i>C. limicola</i> (%)	32,4	49,8
Prof. media máx. producción S ^o (cm)	85,0	100
Tiempo generación <i>C. phaeobacteroides</i> (días)	1,8	9,3
Tiempo generación <i>C. limicola</i> (días)	7,9	29
Prof. media máximo Bchlor-e (cm)	90	90
Prof. media máximo Bchlor-c (cm)	85	94

458 nm) se localiza en la zona extremo del espectro de luz que atraviesa el filtro.

En la tabla 1 se representa el resumen de las características analizadas en el presente estudio. La calidad de la iluminación parece determinar el crecimiento diferencial entre poblaciones de Clorobiáceas. El filtro actínico favorece la población de *C. phaeobacteroides* en relación a *C. limicola*. La intensidad de luz no tiene este carácter discriminatorio pero una reducción del 20% en la intensidad de luz inicial favorece que el máximo de actividad fotosintética se localice unos 10 cm por encima en la columna de agua. La concentración de S^o es inferior en la columna con filtro posiblemente relacionada con la menor intensidad de luz en esta columna de agua.

La competencia entre *C. limicola* y *C. phaeobacteroides* se produce en relación a la concentración de sulfhídrico y por las longitudes de onda capaces de poner en funcionamiento el sistema fotosintético. Por lo que la calidad de luz (y no la intensidad de luz) en nuestro sistema experimental en el que la concentración de sulfhídrico no es limitante para su desarrollo, es quien determina el enriquecimiento de una determinada población de bacterias verdes del azufre. Un estudio más detallado en el laboratorio con la utilización de la fibra óptica conectada a un espectrorradiómetro nos daría más información acerca del espectro de luz por el que compiten ambas poblaciones de bacterias Clorobiáceas.

El filtro actínico, en condiciones naturales, actúa como una columna de agua de características parecidas a la columna de agua del lago de Banyoles (VILA, 1982). Con este trabajo se aporta más información en relación a la ausencia de poblaciones de *C. limicola* en dicho lago de Banyoles (Gironá).

BIBLIOGRAFÍA

- ABELLA, C.A., 1980. *Dinámica poblacional comparada de bacterias fotosintéticas planctónicas*. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
- MONTESINOS, E., 1982. *Ecofisiología de la fotosíntesis bacteriana*. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
- PACHMAYR, 1960. *Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser*. Ph. D. Thesis, Munich Univ.
- PIBERNAT, V., GARCÍA-GIL, L.J. & ABELLA, C.A., 1991. (1992). Descripció d'un model experimental de columna de Winogradsky. Parametres físics i químics. *Scientia gerundensis*, 17: 55-62.
- KIRK, J.T.O., 1979. Spectral distribution of Photosynthetically Active Radiation in some south-eastern australian waters. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 30: 81-91.
- VAN GEMERDEN, H., 1981. Coexistence of *Chlorobium* and *Chromatium* in a Sulphide Limited Continuous Culture. *Arch. Microbiol.*, 129: 32-34.
- VAN GEMERDEN, H., 1987. Competition between Purple Sulphur bacteria and Green Sulphur bacteria. Role of sulfide, sulfur and polysulfides. *Acta Academica Aboensis*, 47 (2): 13-27.
- VILA, X., 1992. *Microorganismes planctònics fotosintètics i composició espectral de la llum a la zona lacustre de Banyoles*. Tesina Licenciatura, Inst. Ecolog. Aquatica, Univ. Girona.