

DINÀMICA I ESTRATIFICACIÓ DE POBLACIONS BACTERIANES FOTOTRÒFIQUES EN UNA CUBETA MEROMÍCTICA DEL LLAC DE BANYOLES *

per

CARLES ABELLÀ, EMILI MONTESINOS i RICARD GUERRERO

Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències i Institut de Biologia Fonamental.
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra

SUMMARY

Dynamics and stratification of bacterial phototrophic populations in a meromictic basin of Banyoles lake.

The photosynthetic bacteria of a meromictic basin of Banyoles lake (Banyoles III) was beweekly studied during one and a half year (1977-1978).

Banyoles III is a basin separated of the rest of the lake by shallow waters. It presents meromixis of crenogenic origin (sulfated water flows from a hole in bottom).

In the monimolimnion (15-19 m to 25 m) it can be found dense populations of sulfur photosynthetic bacteria, mainly Chlorobium phaeobacteroides, C. phaeovibrioides and C. limicola (Chlorobiaceae, 10^7 - 10^8 cells/ml) and occasionally Chromatium minus (Chromatiaceae, 10^2 - 10^3 cells/ml).

The dynamics of these populations is determined by physicochemical parameters like sulfide concentration, light and temperature. Sulfide, the electron donor, is supplied by Desulfovibrio sp., a sulfate reducing bacteria found in the bottom anaerobic sediments.

The border between oxygenic and anoxygenic waters is defined by the existence of a chemocline, which acts as a diffusion barrier for oxygen.

Mixolimnetic concentrations of chlorophyll a is estimated in 2-4 $\mu\text{g/l}$ over the year, but bacteriochlorophyll d varies between 1 and 50 $\mu\text{g/l}$ in monimolimnion, presenting their maxima in late spring and summer and minimum in winter time.

The types of carotenoids in the two genera account for the relative position in the vertical profile of water column.

* Article basat en la comunicació presentada el dia 15 de desembre de 1977, completat amb dades posteriors, fins al mes de desembre de 1978.

Chlorobiaceae populations are best adapted than the others to lesser available light during summer time (caused by a higher mixolimnetic turbidity) and the consequence of this adaptation is a higher value in the specific content of photosynthetic pigments, 15 μg Bchl d per mg of protein, in comparison to 1-2 μg Bchl d per mg protein in winter time.

Therefore, from this kind of studies we can conclude that the use in aquatic microbial ecology of the mentioned biochemical parameters provides an expanded view of the metabolic adaptation of photosynthetic bacteria to different physicochemical conditions of the habitat.

INTRODUCCIÓ

L'objectiu principal de l'ecologia microbiana ha estat el d'avaluar l'activitat i biomassa de les comunitats de microorganismes mitjançant aproximacions quantitatives. En voler portar a terme aquest objectiu, l'ecòleg microbià s'enfronta constantment amb grans dificultats tècniques degut a la petita grandària dels microorganismes, a l'associació d'aquests microorganismes al material detrític i a la dificultat de saber si en un moment determinat aquests microorganismes estan desenvolupant la seva activitat potencial.

En relació amb aquests problemes, els mètodes de recompte directe (anomenat habitualment «enumeració total») amb el microscopi òptic i electrònic, només ofereixen resultats referents al nombre de cèl·lules observades sense discriminar si aquestes es troben actives o no. Per una altra part, els mètodes de recompte després de sembrar en plaques de PETRI («enumeració viable») són necessàriament selectius, ja que no hi ha cap medi i/o condició de cultiu que permeti el creixement de tots els microorganismes potencialment actius, i per tant es produeixen subestimes del nombre real de microorganismes vius.

La incorporació de les tècniques bioquímiques d'anàlisi de components cel·lulars que intervenen en el metabolisme actiu (ATP, GTP, DNA, RNA, proteïnes, pigments fotosintètics, etc.) ofereixen grans possibilitats d'avaluar la biomassa activa doncs reflecteixen les condicions fisiològiques de creixement i l'estat metabòlic dels microorganismes.

L'estudi dels bacteris planctònics ha estat dirigit fonamentalment vers els bacteris heteròtrofs, és a dir, aquells que poden ésser cultivats en placa amb medis nutritius. D'altra banda, l'estudi d'aquest grup ha estat lligat a l'interès dels productors secundaris microbians que tanquen el cicle de la matèria en els ambients aquàtics. Però els bacteris no són únicament descomponedors; alguns grups són productors primaris que aprofiten l'energia lumínica i utilitzen H_2S com a font d'electrons.

Els bacteris fotosintètics han estat menyspreats com a productors primaris a la natura, des del punt de vista quantitatiu. Hom els considera grups ancestrals, i quasi testimonials, d'altres tipus de fotosíntesi, però sense considerar-los importants en els processos de transformacions energètiques dels medis aquàtics.

Aquesta idea va essent abandonada de mica en mica quan es coneixen millor els diferents tipus de llacs i, sobre tot, quan hom comença a portar a terme estudis exhaustius introduint en la recerca tècniques diferents de les clàssiques (mètodes d'anàlisi de pigments fotosintètics, avaluació bioquímica de la biomassa bacteriana, etc.). Un altre factor important a tenir en compte és que la localització dels bacteris fotosintètics en la columna d'aigua, i llur concentració, no és fixa al llarg de l'any, ja que segueixen un cicle en funció de l'estratificació de les aigües i de la presència o absència de H_2S i llum.

El fet determinant de que aquestes poblacions passessin desapercubudes obeeix a que els limnòlegs estudiaven els pigments fotosintètics del fitoplancton seguint l'absorbència des de 400 a 700 nm, pel qual no detectaven els pigments fotosintètics bacterians, que tenen màxims d'absorció situats més cap a l'infraroig (700 a 1.020 nm) i cap al violat de l'espectre. Aquesta darrera característica, junt amb el fet de que són microorganismes anaerobis, els permet fotosintetitzar a més gran fondària, per sota del punt de compensació de les algues, degut a la major penetració de la llum d'onda curta, especialment de les radiacions blaves i blau-verdoses.

Els estudis i resultats que hom presenta a continuació, portats a terme al llarg d'un any i mig en una de les cubetes del llac de Banyoles, representen un exemple dels fets esmentats.

MATERIAL I MÈTODES

Zona d'estudi

Hom va estudiar una de les cubetes (la III, de sud a nord) del llac de Banyoles. Aquesta cubeta està situada al NE del llac i es troba relativament aïllada d'ell per zones poc fondes d'uns 4-5 metres d'aigua (figura 1). Les seves característiques morfològiques s'indiquen en la taula 1. Les característiques físico-químiques han estat descrites en un altre article.³ La zona és coneguda a Banyoles com a «Cap de Bou».

Al llarg del cicle anual, la columna d'aigua de la cubeta té dos tipus diferents d'estratificació, tèrmica i química. Això la converteix en un lloc ideal per a l'estudi dels bacteris fotosintètics en relació a les interfases de densitat que es formen a l'aigua al llarg de l'any.

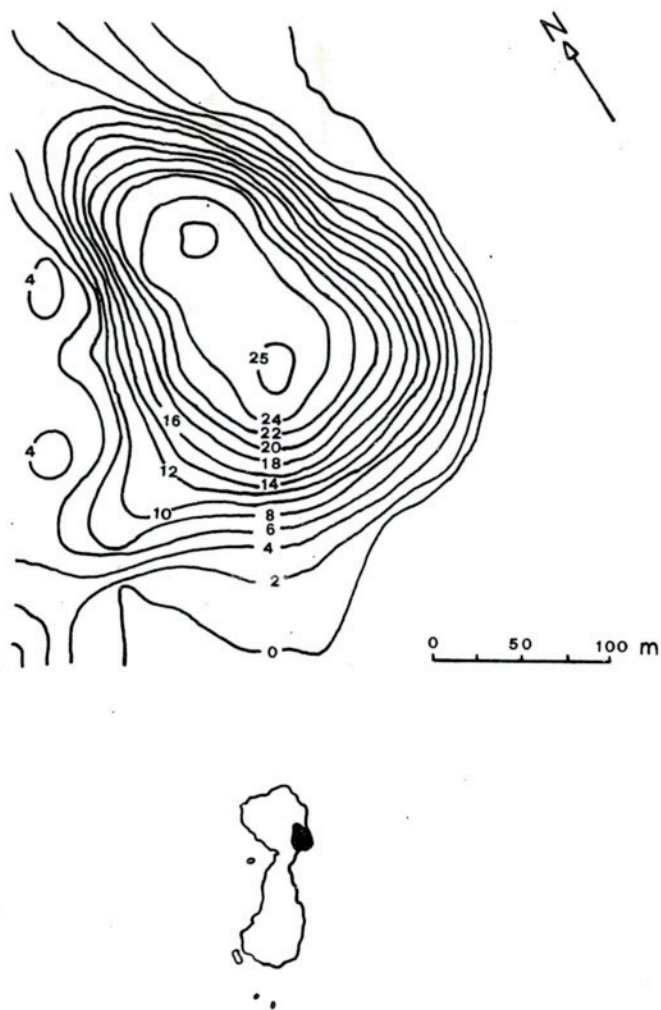


FIG. 1.— Mapa batimètric de la cubeta III del llac de Banyoles. En la part inferior hom indica la seva situació en el llac.

La cubeta III del llac de Banyoles (Banyoles III) és meromíctica, és a dir, no es barreja del tot, ni a la tardor ni a la primavera, degut a la diferent densitat de les dues capes d'aigua (mixolimnion, o capa oxigènica amb mescla vertical, i monimolimnion, o capa anoxigènica no barrejada). Aquest fet ve determinat per l'enriquiment de sulfats en el fons degut a l'entrada d'aigua freàtica que dissol els guixos (meromixis crenogènica).

El fons de la cubeta presenta en la zona central (25 m de fondària) una xemeneia d'uns 20 m de diàmetre que arriba fins als 125 m, plena d'un sediment tou (densitat 1,12) compost per cristalls de CaSO_4 i CaCO_3 que es mantenen en suspensió degut a la turbulència creada per l'entrada d'aigua en profunditat.

TAULA 1.— Paràmetres morfomètrics de la cubeta III del llac de Banyoles. Les dades han estat obtingudes a partir de la figura 1, seguint les definicions de Hutchinson (1957)

Area de la superfície	$75 \times 10^3 \text{ m}^2$
Volumen total (V)	$819 \times 10^3 \text{ m}^3$
Volumen promig del mixolimnion	$721 \times 10^3 \text{ m}^3$
Volumen promig del monimolimnion	$98 \times 10^3 \text{ m}^3$
Profunditat màxima (aigua, Z_m)	25 m
Profunditat màxima total (aigua-sediment)	125 m
Profunditat mitja (aigua, $z = \frac{V}{A_o}$)	10,9 m
Profunditat relativa $Z_r = \frac{50 Z_m \sqrt{\pi}}{\sqrt{A_o}}$	0,08
Longitud (L)	337 m
Amplada (a)	275 m
Perímetre (L_o)	1.100 m
Desenvolupament de la vora ($D_L = L_o / 2 \sqrt{\pi A_o}$)	1,13
Desenvolupament del volum ($D_v = 3z / Z_m$)	1,31
Profunditat del centre de gravetat (Z_g)	8 m

Mostratge i anàlisi físico-química de l'aigua

Les mostres es prenen quinzenalment, a la mateixa hora (10 a 11 am), seguint un perfil vertical situat sobre el punt de profunditat màxima. Hom utilitza una ampolla de Van Dorn de 8 litres i una ampolla de Ruttner transparent de 2 litres amb termòmetre incorporat.

La temperatura de la columna d'aigua es mesurava en el llac amb un termistor (resistors NTC de Miniwatt) enllaçat per un cable coaxial a un medidor Alpha-Meter situat a la superfície; la conductivitat es determinava amb un conductímetre Chemtrix 700; l'oxigen era mesurat «in situ» amb un oxímetre Chemtrix 300, i, en algunes mostres, també en el laboratori pel mètode de Winkler. Aquestes mostres es posaven en ampolles del tipus DBO de 300 ml que es fixaven amb IK i MnSO_4 . Per l'anàlisi del sulfídric s'utilitzaven els mateixos tipus

d'ampolles, però es fixaven amb CH_3COOZn i NaOH . També s'omplien ampolles estèrils de 100 ml per al recompte i cultius bacterians, així com ampolles de 2 litres per l'anàlisi de pigments, proteïnes i ions químics, determinats aquests últims pels mètodes descrits per STRICKLAND i PARSONS (1968). El recompte microbià directe («total») es realitzà sobre filtres de membrana segons la tècnica de LUMPINKS i ARVESON (1968).

Pigments fotosintètics i proteïnes totals

Hom filtrava un volum de mostra (0,5-2 litres) sobre filtres de membrana Sartorius de 47 mm de diàmetre i $0,45 \mu\text{m}$ de porus en els que prèviament s'havia depositat una capa fina de carbonat magnèsic. Acabada la filtració hom recollia el precipitat, disolvent-lo en acetona al 90 % i deixant-lo 24 h a 4°C . Després se centrifugava a $4000 \times g$ durant 5 minuts per eliminar el precipitat de carbonat magnèsic, recollint el sobrenedant amb els pigments. Hom determinava aquests seguint l'espectre d'absorció entre 350 i 850 nm, amb un espectrofotòmetre Philips Unicam SP-1700, quantificant les bacterioclorofil·les *a* i *d* segons les fórmules de TAKAHASHI i ICHIMURA (1970) i la clorofilla *a* segons STRICKLAND i PARSONS (1968). La identificació dels pigments es realitzà prèviament per cromatografia en paper Whatman 3MM (20×20 cm) tenint en compte llur espectre d'absorció en diferents dissolvents i llur coeficient de repartició.

L'extracció de les proteïnes del sediment resultant es feia amb NaOH 1N a 100°C i l'anàlisi es portava a terme seguint una modificació del mètode de LOWRY⁴ utilitzant albúmina de sèrum boví com a estàndard. Per a l'eliminació de les interferències dels sulfurs es tractà l'extracte amb $50 \mu\text{l}$ de H_2O_2 durant 15 minuts a 50°C .

Espectres d'absorció «in vivo»

Es determinaven a partir dels extractes crus. Se centrifugaven 2-3 litres de mostra per centrifugació contínua (flux de 100 ml/min) en una centrifugadora Sorvall RC2-B a $10\,000 \times g$. El sediment es resuspensia en 2 ml d'amortidor Tris 25 mM (pH 7,75), es rentava tres vegades, i se sonicava durant 5 min amb un aparell Branson model B-12, a 50 W i 4°C . Posteriorment se centrifugava a $20\,000 \times g$ durant 1 hora i es determinava l'espectre d'absorció del sobrenedant (que conté els cromatòfors) entre 400 i 1100 nm.

RESULTATS

Distribució vertical dels microorganismes fotosintètics

Els canvis en les propietats de les poblacions planctòniques fotosintètiques van ser seguits comparant els espectres d'absorció «in vivo» (fig. 2a) i els espectres d'absorció dels extractes acetònics (fig. 2b) de les mostres.

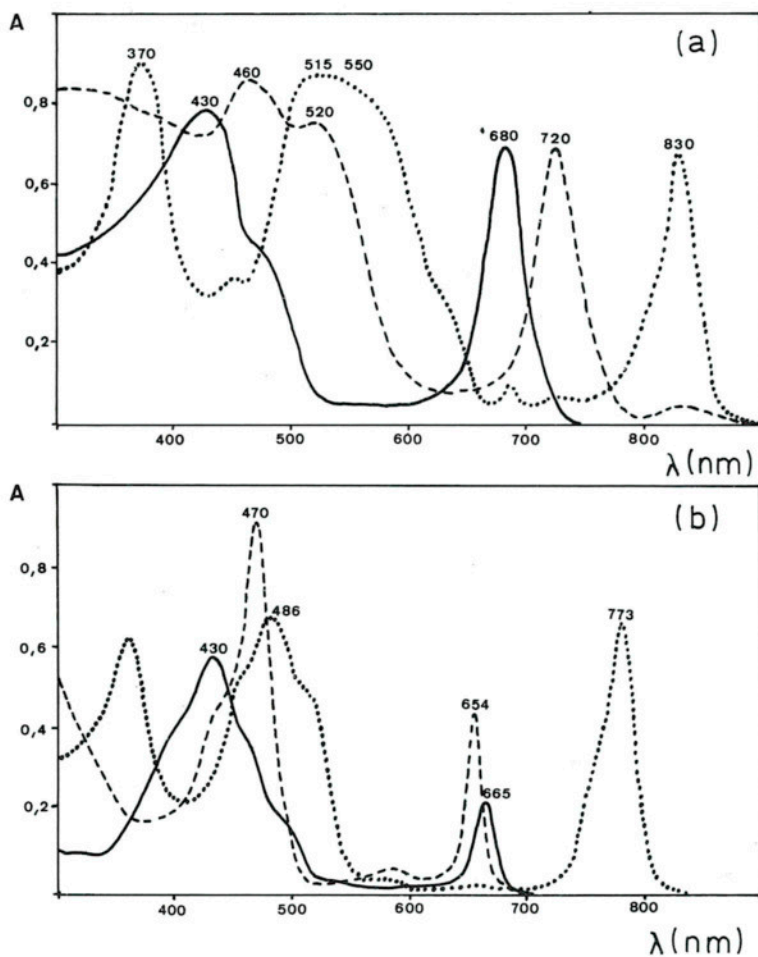


FIG. 2.— Espectres d'absorció «in vivo» (a) i dels extractes acetònics (b) d'algues (—), *Chromatium* (.....) i *Chlorobium* (----). Les mostres procedeixen, respectivament, del mixolimnion i de capes rogenques i de capes marroneses del monolimnion.

L'espectre d'absorció típic d'una mostra del mixolimnion posa de manifest un primer pic en la regió blava (434 nm «in vivo» i 430 nm a l'extracte) i un segon pic en la regió vermella (680 nm «in vivo» i 665 nm a l'extracte) indicant l'existència de clorofilla *a*. Tot això demostra que els únics organismes fotosintètics existents en el mixolimnion corresponen a les algues.

El monimolimnion presenta capes de diferents colors al llarg de l'any. Durant l'hivern únicament es troba aigua de color marró clar, mentre que a l'estiu i principis de la tardor hi ha una capa superior d'aigua vermella i una altra més abaix d'aigua marró intens.

L'espectre d'absorció corresponent al monimolimnion d'aigua marró presenta una banda ampla en la regió blau-verdosa (pics a 460 i 520 nm «in vivo» i 470 nm a l'extracte) i un segon pic a 720 nm «in vivo» i 654 nm a l'extracte, degut a la bacterioclorofilla *d*; això indica la presència de bacteris fotosintètics verds del sofre (Clorobiàcies). Durant l'estiu apareix una capa superior d'aigua rosada a 14 m, just en la interfase H_2S-O_2 , que presenta pics d'absorció «in vivo» a 370 nm, entre 515 i 550 nm i a 830 nm, aquest últim degut a la bacterioclorofilla *a*; això demostra l'existència de bacteris fotosintètics vermells del sofre (Cromatiàcies).

D'aquesta manera, Banyoles III presenta durant tot l'any dues zones diferenciades en el que respecta al tipus de fotosíntesi. Hi ha una zona amb fotosíntesi deguda a algues (oxigènica i per tant aeròbia) i una altra zona amb fotosíntesi deguda a bacteris (sulfogènica i anaeròbia). Ambdues zones són conseqüència de la diferent distribució dels factors físico-químics, els quals determinen també dues zones físico-químiques: el mixolimnion, que correspon a una zona aeròbia on té lloc la fotosíntesi produïda pel fitoplancton, i el monimolimnion, que correspon a una zona anaeròbia on té lloc la fotosíntesi dels bacteris fotosintètics del sofre.

Aïllaments bacterians

La determinació inicial de les espècies fotosintètiques més abundants fou realitzada d'acord a les característiques morfològiques i estructurals observades per microscòpia òptica i electrònica, tant de les mostres d'aigua com dels cultius purs aïllats. Per a una identificació més precisa, foren utilitzades les dades de les anàlisis de pigments i els espectres d'absorció «in vivo».

Del monimolimnion han estat aïllades cinc espècies bacterianes en cultiu pur; s'utilitzà la tècnica d'agar en tub amb inòcul profund, amb

el medi de PFENNIG citat a LAPAGE *et al.* (1970). La morfologia i anàlisi de pigments d'aquestes espècies són les següents:

1. Cèl·lules gramnegatives, amb forma de vibri (semilunars), que amiden $0,8 \times 1,8 \mu\text{m}$ i que formen colònies petites de color marró. Els seus pigments fotosintètics es troben en vesícules típiques («clorosomes») visibles en talls ultrafins al microscopi electrònic². Les anàlisis de pigments demostren que contenen bacterioclороfilla *d* i carotenoids aril derivats del β -carotè, principalment iso-renieratè. Aquests pigments són propis de les espècies marronoses de bacteris fotosintètics verds del sofre¹⁰ i són responsables dels pics d'absorció a 720 i 520 nm («in vivo») i a 654 i 470 nm (extractes acetònics), tant als cultius purs com a mostres del monimolimnion. Les suspensions cel·lulars tenen un color marró groguenc intens, viuen en ambients anaerobis i poden utilitzar H_2S com a font d'electrons excretant sofre elemental a l'exterior. Basant-se en totes aquestes característiques aquesta espècie fou determinada com a *Chlorobium phaeovibrioides*.

2. Cèl·lules de característiques bioquímiques similars a l'espècie anterior, però en forma de bacils rectes, de $0,8 \times 2,7 \mu\text{m}$, que hem determinat com a *Chlorobium phaeobacteroides*.

3. En proporció més baixa van ésser aïllades cèl·lules gramnegatives, immòbils, en forma de bacils rectes o una mica corbats, de $1,1 \times 2,0 \mu\text{m}$, freqüentment formant cadenes curtes de 3 a 4 individus. Els seus pigments fotosintètics es troben en clorosomes, segons s'observa en talls ultrafins al microscopi electrònic. Els espectres d'absorció dels cultius indiquen que tenen bacterioclороfilla *c* i carotenoids, principalment clorobactè, responsables de la coloració verdosa intensa que presenten les suspensions cel·lulars. L'espècie fou determinada com a *Chlorobium limicola*.

4. En algunes ocasions, quan la capa superior del monimolimnion (14 m) era de color rogenc, s'han observat bacteris fotosintètics vermells del sofre que corresponen a l'espècie *Chromatium minus*, amb les mateixes característiques que el bacteri descrit a la llacuna de Sisó per GUERRERO i ABELLÀ (1978), i

5. S'han aïllat bacteris sulfato-reductors del gènere *Desulfovibrio*, i s'han cultivat en medi líquid. Són vibris gramnegatiu, anaerobis estrictes, mòbils per flagels polars. Tenen citocrom c_3 i desulfoviridina, pigments posats de manifest per un pic màxim d'absorció a 630 nm en els espectres d'absorció «in vivo» i per un pic de fluorescència vermella quan els extractes crus (en NaOH 2N) s'exciten amb llum de 375 nm. Es troben en baixes densitats al monimolimnion però en gran quantitat al sediment de les parets anaeròbies de la cubeta. Són els responsables de la producció de H_2S .

Finalment, s'han fet sembres en placa de la població heterotròfica, aeròbia o facultativa, del mixolimnion i del sediment tou en suspensió (microaeròfil) de la xemeneia central.

Distribució quantitativa del fitoplancton, dels bacteris fotosintètics i dels altres bacteris

Els canvis de la població bacteriana van ésser avaluats mitjançant la biomassa (pes fresc) obtinguda per recompte directe al microscopi

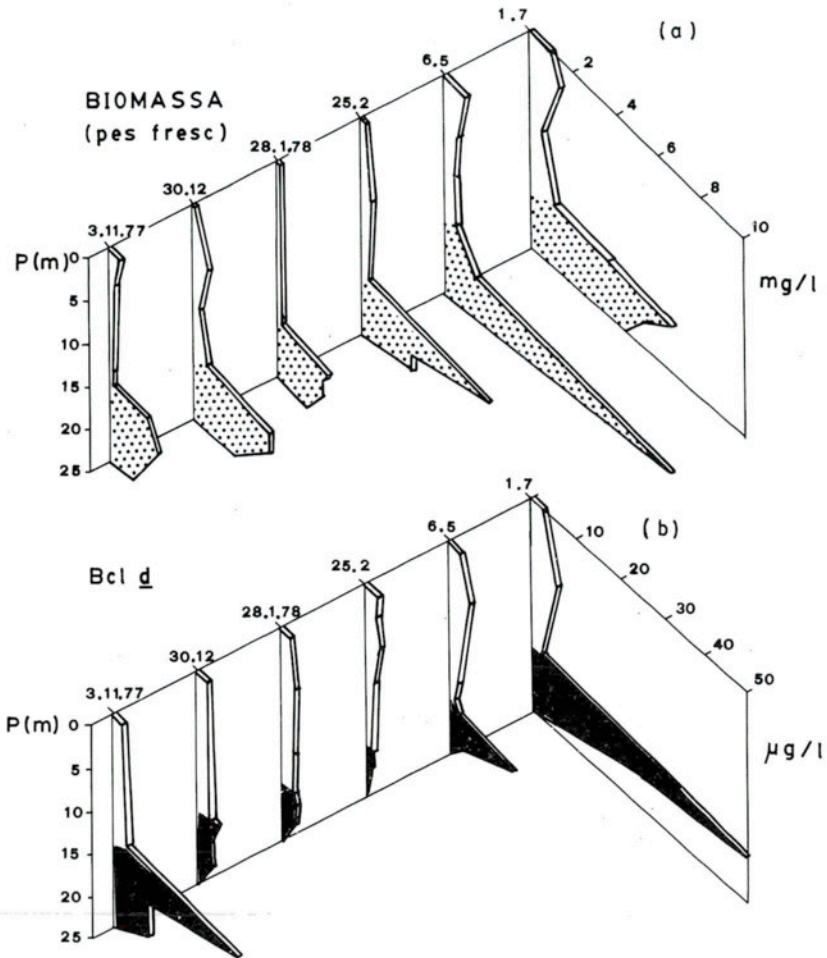


FIG. 3.—Variacions estacionals dels perfils verticals de la biomassa (a) i de la concentració de clorofil·la *a* i bacterioclorofil·la *d* (b) en la cubeta III del llac de Banyoles.

òptic. A Banyoles III hom detectà tres zones amb màxims de biomassa bacteriana que es corresponen bé amb les tres zones definides per les característiques físico-químiques i microbiològiques³: mixolimnion (amb bacteris heterotròfics), monimolimnion (amb bacteris fotosintètics) i sediment tou en suspensió.

Al mixolimnion la biomassa bacteriana és màxima en primavera i estiu (11 mg/l, que correspon a 10^5 cèl·lules/ml) i mínima a l'hivern (0,1 mg/l, que correspon a 10^3 cèl·lules/ml). La biomassa total de *Chlorobium* en el monimolimnion és més alta i es manté més o menys constant durant l'hivern (36 mg/l, que correspon a 3×10^7 cèl·lules/ml); en primavera es produeix un considerable increment cap al fons (tres vegades més gran als 24 metres); a l'estiu i tardor la biomassa es distribueix més uniformement (vegeu la figura 3a). Al sediment tou situat a la xemeneia central la biomassa bacteriana és unes 1.000 vegades superior a la del monimolimnion.

Els canvis verticals i estacionals en els organismes fotosintètics de Banyoles III es mesuraren estimant els seus pigments clorofil·lics. La quantitat de clorofilla *a* en el mixolimnion no supera mai els 4 µg/l, el que indica una població algal pobre. Això està d'acord amb el que calia esperar en un llac oligomesotròfic, i és igual al que passa a la resta del llac de Banyoles.

La concentració de bacterioclolorofilla *d* oscil·la entre 1 i 50 µg/l, essent màxima entre els 16 i 19 m durant la primavera-estiu i mínima a l'hivern (vegeu la figura 3b).

El sediment líquid de la xemeneia central és microaeròfil ($E_h=0$ a 200 mV)³ i es troben grans quantitats (1.000 vegades més que el monimolimnion) de pigments fotosintètics que donen una intensa coloració groga als extractes acetònics. No obstant, aquests pigments no estan associats a formes actives d'organismes fotosintètics, ja que es troben absorbits als cristalls de $CaSO_4$ i $CaCO_3$. Són productes molt recalci-trants de degradació de clorofil·les i carotenoids⁹ originats durant la caiguda i posterior degradació dels bacteris fotosintètics verds del monimolimnion.

Dinàmica estacional en funció de la posició de la termoclina i de la quemoclina

En la figura 4 s'observa la distribució de dues poblacions de bacteris fotosintètics (Cromatiàcies i Clorobiàcies) al llarg de les quatre estacions de l'any.

A l'hivern, l'única població present és la de les Clorobiàcies, que es troba a partir dels 18 m. Hom pot observar la disposició de la capa

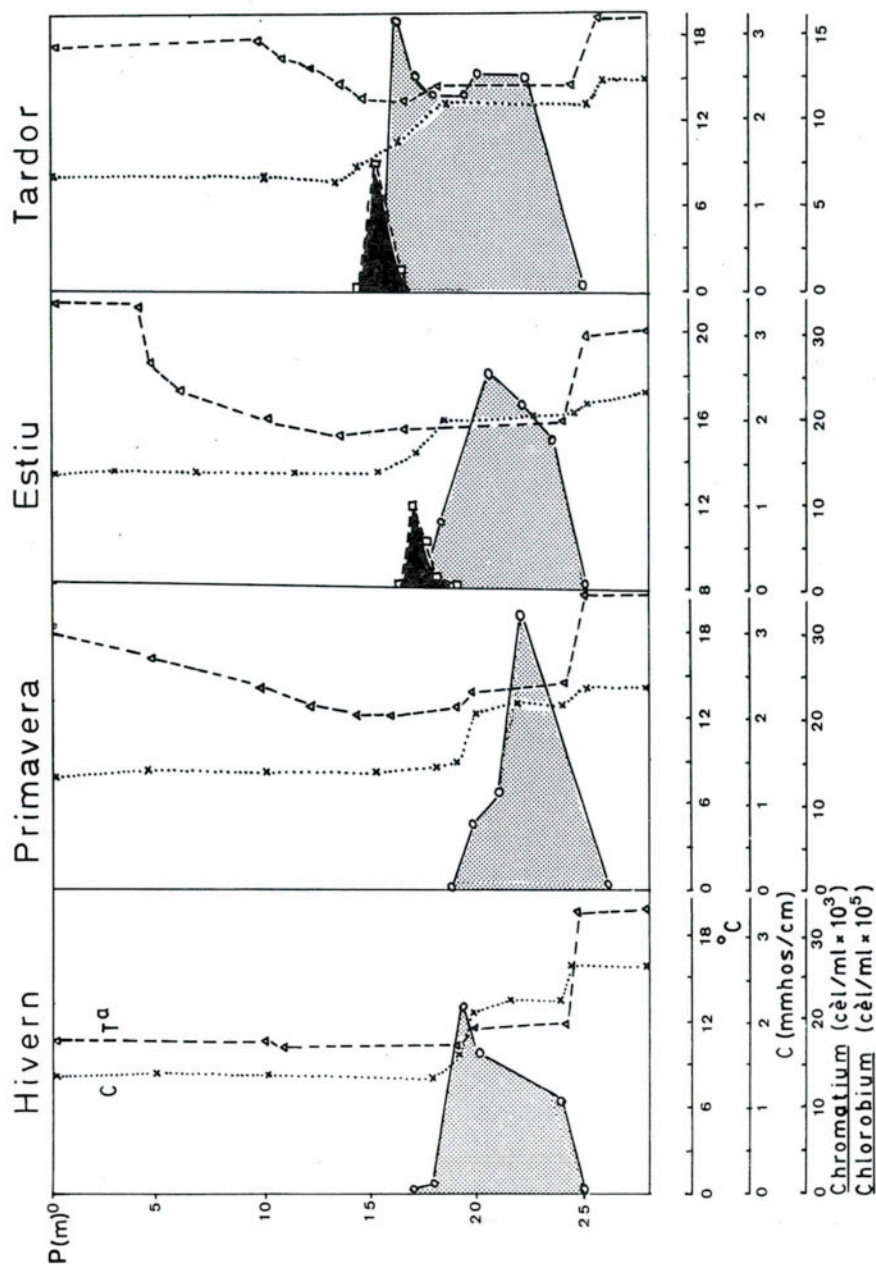


FIG. 4. — Distribució estacional dels perfils verticals de temperatura (----) i conductivitat (.....) en relació al nombre total de *Chromatium* (trama fosca) i *Chlorobium* (trama clara) en la cubeta III del llac de Banyoles.

bacteriana justament on comença la quemoclina i també la manca d'estratificació tèrmica en la resta de la columna d'aigua.

En primavera es comença a formar la termoclina, però la situació és tanmateix idèntica en profunditat, on es presenta una capa més potent de Clorobiàcies.

A l'estiu la situació ha canviat molt, ja que s'ha establert una clara termoclina i la conductivitat comença a augmentar a partir dels 15 m. Això implica una separació de les aigües del hipolimnion i per tant permet una difusió a partir de la quemoclina (principalment de H_2S i SO_4^{2-}); com a conseqüència, apareixen dues poblacions separades dels bacteris citats. La població de Cromatiàcies està per sobre de les Clorobiàcies, degut al contingut i tipus de carotenoids que són diferents. Les Clorobiàcies també puguen fins a 17-18 m, encara que el màxim continua als 19-20 m.

Per últim, durant la tardor i abans de la mescla hivernal, aquesta distribució encara es fa més palesa, en situar-se ambdues poblacions més a prop de la termoclina (a l'entorn dels 13 m).

Aquesta última situació és la que permet més diversitat de poblacions donades les condicions presents en la cubeta III de Banyoles, que coincideixen amb un apropament de les interfases de temperatura (termoclina) i de conductivitat (quemoclina).

DISCUSSIÓ

La utilització simultània de tècniques d'anàlisi físico-químiques, microbiològiques i bioquímiques ha permès una aproximació a la caracterització del nínxol ecològic de la cubeta III del llac de Banyoles des del punt de vista microbiològic. Mitjançant l'estudi dels paràmetres físico-químics s'han definit les condicions ambientals en que es desenvolupen les poblacions microbianes, podent dividir la cubeta en tres zones³:

1. Mixolimnion (0 a 15-19 m), zona superior oxigenada amb barreja vertical a l'hivern i estratificació a l'estiu.

2. Monimolimnion (15-19 fins 25 m), zona anòxica més densa que l'anterior degut a la seva major concentració en sulfats (i per tant de més alta conductivitat); hi ha H_2S i durant tot l'any presenta una temperatura 2°C superior a la capa d'aigua de la part més profunda del mixolimnion.

3. Sediment tou en suspensió situat en la xemeneia central (dels 25 als 125 m).

Aquestes característiques físico-químiques feien sospitar l'existència de determinades poblacions de microorganismes fotosintètics, especialment en el cas del monimolimnion. Pràcticament les úniques

poblacions anaeròbies que poden desenvolupar-se en forma planctònica amb densitats grans corresponen a bacteris fotosintètics. Mitjançant les anàlisis microbiològiques i de pigments hom va poder constatar que en el monimolimnion existien poblacions de bacteris fotosintètics del sofre, principalment Clorobiàcies, representades per *Chlorobium phaeobacteroides*, *Chlorobium phaeovibrioides*, *Chlorobium limicola* i, ocasionalment, Cromatiàcies, representades per *Chromatium minus*. Al mixolimnion i sediment tou microaeròfil hom estudià solament la població heterotròfica, que és la més abundant. El sediment anaerobi de les parets laterals presenta gran quantitat del reductor del sulfat *Desulfovibrio*, que es pot aïllar també al monimolimnion en concentracions molt més baixes. Aquest bacteri és el responsable de la producció de H_2S en tota la cubeta, essent el subministrador de poder reductor per als bacteris fotosintètics.

Mitjançant les anàlisis bioquímiques dels pigments fotosintètics (principalment seguint l'absorció «in vivo» o d'extractes acetònics de les mostres), hom va poder constatar l'existència de dues zones de fotosíntesi: una correspon al mixolimnion (algues) i l'altra al monimolimnion (bacteris fotosintètics); aquestes dues zones estan directament determinades pels factors físico-químics. Les anàlisis bioquímiques dels pigments permeten també d'establir una concordància amb les determinacions taxonòmiques degut a la identificació de clorofilla *a* (algues), bacterioclорofilla *a* (Cromatiàceas) i bacterioclорofilla *d* (Clorobiàcies).

Així mateix, les característiques particulars d'absorció de la llum de les cèl·lules vives permeten explicar el fenomen de selecció de les poblacions de *Chromatium* i *Chlorobium* en el monimolimnion. Degut al coeficient d'extinció de la llum a l'aigua, en augmentar la profunditat la llum s'enriqueix en radiacions d'onda curta (470 a 560 nm), les quals són més penetrants. A la profunditat a la qual es desenvolupen les poblacions de bacteris fotosintètics (en aquest cas entre 14 i 25 m) no arriben pràcticament radiacions lluminoses d'onda llarga doncs aquestes són absorbides en els primers metres. Per tant, aquestes poblacions han d'estar fotosintetitzant essencialment gràcies a la llum captada pels seus carotenoids (460 a 550 nm). Com el procés de fotosíntesi depèn en gran part dels carotenoids, es produeix una selecció de les poblacions en favor dels bacteris verds, els quals presenten carotenoids que absorbeixen a longituds d'onda més curtes (*C. phaeobacteroides*, de 460 a 520 nm), en comparació amb els bacteris vermells (*Chromatium*, de 515 a 550 nm) (vegeu la figura 2a). Per tant, *Chromatium* només es pot desenvolupar en la capa superior del monimolimnion quan aquest arriba a 14 metres (durant l'estiu).

El desenvolupament dels bacteris fotosintètics del sofre en els llacs meromíctics ha estat estudiat per molts autors, però quasi sempre durant les èpoques d'alta densitat poblacional (principalment a l'estiu). Aquest treball explica la seva distribució en relació a les condicions ambientals i a l'estat fisiològic durant el cicle anual.

Durant els períodes de proliferació bacteriana massiva en profunditat, la transparència de l'aigua en superfície era elevada, i la termoclina ben marcada, però l'oxigen minvava la seva concentració des de la superfície fins determinada profunditat (normalment entre els 10 i 17 m), on desapareixia. El sulfhídric del monimolimnion minvava bruscament en arribar als 17 m. En la zona de transició entre l'oxigen i el H_2S apareixen poblacions molt denses de bacteris fotosintètics que formen capes primes. La formació d'aquesta capa reflexa el delicat equilibri de condicions físico-químiques necessari: absència d'oxigen, llum i presència de H_2S .

Durant l'hivern, malgrat el seu pobre creixement, aquestes poblacions segueixen actives (com ho demostra la presència de pigments no degradats) i continuen essent influenciades pels mateixos paràmetres físico-químics. La temperatura més baixa al monimolimnion durant aquesta època ($4^{\circ}C$ menys que a l'estiu, figura 5a) pot ésser un dels factors determinants del menor desenvolupament bacterià (vegeu la figura 3a).

Hi ha un nou aspecte en els estudis fisiològics «in situ» dels bacteris fotosintètics que ha resultat estar relacionat amb la síntesi de pigments clorofil·lics d'aquestes poblacions en les diferents estacions de l'any. Per estudis de laboratori^{12, 1}, és sabut des de fa anys que els organismes fotosintètics augmenten el seu contingut en pigments quan són sotmesos a baixes intensitats lumíniques, aconseguint així una eficiència més gran en la fotosíntesi.

Hem observat un contingut específic més gran de pigments en les poblacions que es desenvolupen a l'estiu (unes 15 vegades superior a aquells que es desenvolupen a l'hivern) (figs. 5b i 5c). La llum incident en la cubeta està fortament atenuada a la primavera-estiu per: (1) el creixement més alt d'algues al mixolimnion (degut a la formació de la termoclina), (2) l'acumulació de partícules en suspensió en la interfase de densitat mixolimnion-monimolimnion, i (3) la pròpia densitat de la capa de *Chlorobium*. D'aquesta manera, la intensitat lluminosa efectiva a que estan sotmeses aquestes poblacions de bacteris fotosintètics és menor durant la primavera-estiu (menys de 0,1 % de la llum incident a la superfície) que a l'hivern (1-19 %). Aquests resultats estan d'acord amb els obtinguts per KONOPKA i BROCK (1978) en el llac Mendota amb poblacions de cianobacteris.

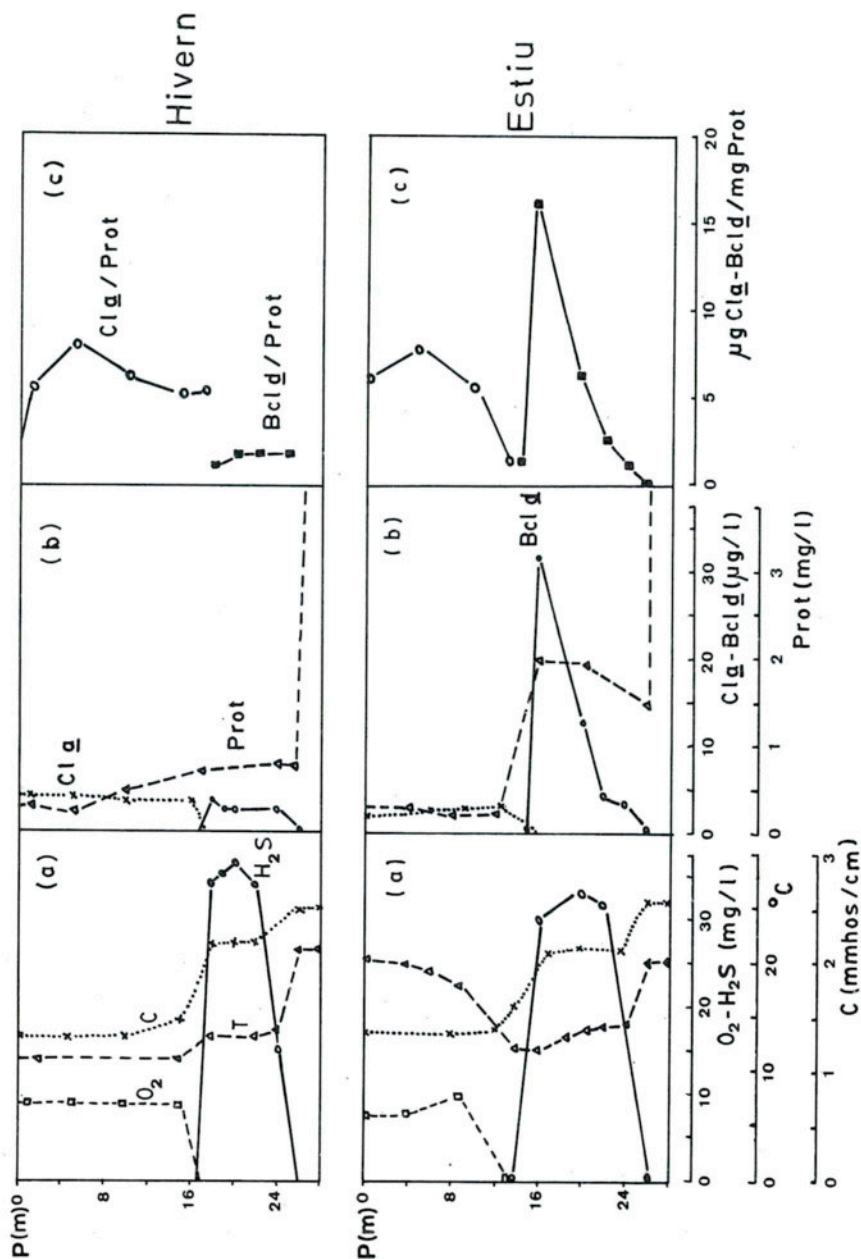


FIG. 5.—Comparació entre la distribució vertical a Banyoles III durant l'hivern i l'estiu dels següents paràmetres: (a) temperatura, conductivitat, oxigen i sulfhídric; (b) clorofil·la *a*, bacterioclорofil·la *d* i proteïnes; (c) contingut específic en clorofil·les.

El conjunt d'experiments i observacions desenvolupats al llarg del treball exposat aporta la conclusió de que l'aplicació de diferents paràmetres bioquímics cel·lulars als estudis d'ecologia microbiana permeten una visió més profunda de l'adaptació metabòlica dels bacteris fotosintètics a les diferents condicions físico-químiques de l'hàbitat.

BIBLIOGRAFIA

1. CLAYTON, R. K. i SISTROM, R. S. — *The photosynthetic bacteria*. «Plenum Press», New York (1978).
2. ESTEVE, M. I., ABELLÀ, C. i GUERRERO, R. — *Identificació i estudi poblacional de bacteris fototròfics a l'estanyol de Sisó (Banyoles)*. Aplicació de tècniques de microscòpia electrònica (1979). (Aquest volum.)
3. GUERRERO, R., ABELLÀ, C. i MIRACLE, M. R. — *Spatial and temporal distribution of bacteria in a meromictic karstic lake basin: relationships with physico-chemical parameters and zooplankton*. «Verh. Intern. Verein. Limnol.» 20: 2264-2271 (1978).
4. HARTREE, R. — *Modification of the Lowry method for measuring protein*. «Anal. Biochem.», 49: 620-650 (1972).
5. HUTCHINSON, G. E. — *A treatise on limnology*. Vol. 1. Wiley & Sons, New York (1957).
6. KONOPKA, A. i BROCK, T. D. — *Changes in photosynthetic rate and pigment content of blue-green algae in lake Mendota*. «Appl. Environ. Microbiol.», 35: 527-532 (1978).
7. LAPAGE, S. P., SHELTON, J. E. i MITCHELL, T. G. — *Media for the maintenance and preservation of bacteria*. A: NORRIS, S. A. i RIBBONS, D. W. (eds.) «Methods in microbiology», vol. 3A, pp. 1-133, Academic Press, London (1970).
8. LUMPKINS, E. D. i ARVESON, J. S. — *Improved techniques for staining bacteria on membrane filters*. «Appl. Microbiol.», 16: 433-434 (1968).
9. MONTESINOS, E. — *Biomasa y actividad de las bacterias fotosintéticas en dos medios acuáticos de diferente nivel trófico*. Tesina de Llicenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona (1978).
10. PFENNIG, N. — *Phototrophic green and purple bacteria: A comparative systematic survey*. «Annu. Rev. Microbiol.», 31: 275-290 (1977).
11. STRICKLAND, J. D. H. i PARSONS, T. R. — *A practical handbook of seawater analysis*. «Bull. Fish. Res. Board Can.», 167: 311 pp. (1968).
12. TAKAHASHI, M. i ICHIMURA, S. — *Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes*. «Limnol. Oceanogr.», 15: 929-944 (1970).
13. TAKAHASHI, M., SHIOKAWA, K. i ICHIMURA, S. — *Photosynthetic characteristics of a purple sulfur bacterium grown under different light intensities*. «Can. J. Microbiol.», 18: 1825-1828 (1972).