

**IDENTIFICACIÓ I ESTUDI POBLACIONAL
DE BACTERIS FOTOTRÒFICS A L'ESTANYOL
DE SISÓ (BANYOLES). APLICACIÓ DE TÈCNiques
DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA ***

per

ISABEL ESTEVE, CARLES ABELLÀ i RICARD GUERRERO

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

SUMMARY

Identification and poblational study of phototrophic bacteria in Sisó pond (Banyoles). Application of electron microscopy techniques.

The bacterial populations of Sisó pond, a small water body located near Banyoles lake (Girona), were examined by transmission and scanning electron microscopy techniques. In this study we can analyze the composition of the bacterial populations of water, mainly composed by photosynthetic bacteria. By means of ultrathin sections of cells and pigments spectra it has been possible to identify the following species: Chromatium minus, Chlorobium phaeovibrioides and Chlorobium limicola. The ultrathin sections revealed the presence of vesicles, which may change in type, number and position, and henceforth to have a taxonomic value. It is also studied the numbers of individuals of the different species, finding that the electron microscopy techniques give lower figures than those of light microscopy. The higher resolution power of electron microscopy permits to know the relative percentage of the two Chlorobium species, which cannot be done by light microscopy because of their small size. Transmission and scanning electron microscopy have proven to be very useful methods in knowing the dynamics of bacterial populations and the morphological changes of cells, both data being essential in the studies of microbial ecology.

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

INTRODUCCIÓ

El microscopi electrònic de transmissió (MET) ha començat a ser àmpliament utilitzat en els treballs d'ecologia microbiana, tant per a la identificació dels microorganismes que componen les comunitats aquàtiques³ com per al coneixement de la seva ultraestructura (DUBININA i KUZNETSOV, 1976). L'alt poder resolutiu d'aquest instrument fa que resulti idoni per a diferenciar totes aquelles estructures cellulars que no poden ser detectades amb el microscopi òptic i per distingir de manera clara les cèl·lules del material detrític.

Malgrat l'evidència d'aquests avantatges, el MET ha estat poc utilitzat en el càlcul del nombre total i de la biomassa bacteriana. WATSON *et al.* (1977), realitzaren assaigs amb el MET utilitzant rèpliques pel recompte dels microorganismes concentrats sobre filtres de membrana i compararen aquests resultats amb els obtinguts per recompte amb el microscopi d'epifluorescència. En el mateix any, BOWDEN (1977) comparà els recomptes amb MET i microscòpia d'epifluorescència. En ambdós casos els autors assenyalaren que la microscòpia electrònica donava una millor precisió en la identificació de formes i aportava la possibilitat de poder diferenciar ràpidament el material detrític. Però, en haver de sotmetre les mostres a una sèrie de manipulacions prèvies al seu examen amb el MET, es produeixen pèrdues de material i és aquest el motiu pel qual els nombres obtinguts en recomptes d'epifluorescència resulten més elevats.

Recentment, LARSSON *et al.* (1978) han emprat en aquests tipus d'estudis tècniques estereològiques, però els procediments basats en talls ultrafins del sediment obtingut per centrifugació de les mostres són massa complicats per a ser utilitzats en els estudis ecològics rutinaris.

En aquest treball, hom descriu els bacteris més abundants trobats a l'estanyol de Sisó (llacuna propera al llac de Banyoles), descrivint alguns detalls de la seva ultraestructura. Hom correlaciona la distribució espacio-temporal bacteriana amb els gradients físico-químics, a la vegada que es proposa un mètode senzill per calcular el nombre total i la biomassa bacteriana, el qual mètode comporta una mínima manipulació de les mostres a fi d'evitar pèrdues.

MATERIAL I MÈTODES

Zona d'estudi

Les poblacions bacterianes estudiades en aquest treball han estat aïllades d'un petit estanyol rectangular (dimensions 26×20 m; màxima

fondària: 11 m; volum: 3.843 m³) situat a uns 200 m a l'oest del llac de Banyoles, a prop de la seva zona central. Ha estat anomenat estanyol de la Ribera Castellana (la qual passa a uns cinc metres de la seva vora) o bé estanyol de Sisó. Les seves característiques morfomètriques han estat descrites en un altre article⁶. L'aigua és molt rica en sulfhídric i pràcticament anaeròbica durant tot l'any.

Mètodes de mostratge

La recollida de mostres es realitzà quinzenalment del gener de 1977 fins el desembre de 1978 amb una ampolla de Ruttner de 2 l de capacitat. Les mostres s'agafaven a diferents profunditats (0, 0,5, 1, 3, 5, 7 i 10 m), en un punt situat aproximadament al centre de l'estanyol.

Per a poder estudiar millor els possibles canvis morfològics i estructurals dels bacteris fotosintètics vermells del sofre (identificats al llarg d'aquest treball com a pertanyents al gènere *Chromatium*) es col·locaren, a diferents fondàries, peces de polispan d'uns 8×8 cm travessades per una corda, la qual es mantenia tensa mitjançant un pes. El líquid retingut a les peces de polispan contenia una elevada concentració de bacteris.

Recomptes per microscòpia òptica

Per als recomptes al microscopi òptic es filtraren 3 ml de cadascuna de les mostres amb un filtre Millipore de 27 mm de diàmetre i 0,45 µm de porus. Els filtres es tenyiren amb fucsina àcida i blau de metilè. En recolectar les mostres hom va evitar al màxim l'exposició a l'oxigen i a la llum. S'utilitzà un microscopi Nikon amb objectiu d'immersió, a 1.000 augments.

Recomptes per microscòpia electrònica de transmissió

Les mostres (de 100 ml) que havien d'ésser observades amb el MET eren centrifugades durant 20 minuts a 8.000 xg. El sediment obtingut es resuspensia en 2 ml d'aigua amb NaCl al 0,9 %. Sobre una reixeta «de trau» coberta amb pel·lícula de carbó o formvar (0,125 g de formvar en 50 ml de dicloroetà) es deposità una part alíquota de 0,01 ml del sediment resuspès. Hom col·locà la reixeta sobre una capa de cera i procedí al secat de la gota amb objecte de què tots els microorganismes presents en 0,01 ml quedessin retinguts sobre la pel·lícula suport. Seguidament, es tenyí amb àcid fosfotúngstic al 1 % (pH 7,2) durant un o dos minuts. Dependent del nombre de microorganismes trobats, es fotografia-

va un determinat nombre de camps, de manera que es pogués donar un valor estadístic als resultats obtinguts, i s'obtenia la mitjana. El nombre total s'obtenia a partir de les dades conegudes de l'àrea de la reixeta, àrea del camp observat i nombre de microorganismes per camp. Mitjançant una ampliadora era possible diferenciar tipus morfològics de microorganismes i calcular les seves freqüències relatives.

Ultraestructura

Hom utilitzà el mètode de RYTER-KELLENBERGER⁷ per a l'obtenció de seccions ultrafines; s'afegien 3 ml d'amortidor veronal a 30 ml de la suspensió bacteriana; la mescla se centrifugava durant 5 minuts a 18.000 xg. El sediment es resuspensia en 1 ml del fixador durant 16 hores a temperatura ambient; després es diluïa en 8 ml de l'amortidor, centrifugant de nou. Finalment, el sediment es resuspensia en 0,03 ml d'agar al 2 % i un cop fred el bloc format es tallava en porcions de 1 mm³ aproximadament. Per a les deshidratacions s'empraven gradients d'acetona (30, 50, 70, 90 i 100 %) i òxid de propilè, i per a les inclusions Araldita segons la tècnica de GLAUERT i GLAUERT (1958), polimeritzant els blocs primer a 50 °C i després a 80 °C. Pels talls ultrafins s'utilitzà un ultramicrotom (LKB III) amb ganiveta de vidre, essent posteriorment recollits en reixetes de 400 mesh i tenyits amb citrat de plom segons el mètode de REYNOLDS (1963). Les microfotografies electròniques han estat fetes amb un microscopi Hitachi HU-12A a 75 kV, amb pel·lícula fotogràfica Negralit.

Microscòpia electrònica de «scanning»

Amb objecte d'estudiar millor la morfologia de les espècies dominants, hom filtrà 20 ml de la mostra sobre filtres Nuclepore de 0,4 µm, els quals van ésser sumergits en glutaraldehid al 3 % en amortidor cadodilat per espai d'una hora a 4 °C. Després d'una deshidratació progressiva en gradients d'acetona, les mostres foren transferides a una disolució d'amilacetat i secades al punt crític. Cada filtre estudiat fou posteriorment recobert per una fina capa d'or de 20 a 30 nm de gruixària. Per a les microfotografies fou utilitzat un microscopi Stereoscan 180 (Cambridge).

RESULTATS

Els estudis realitzats a l'estanyol de Sisó permeten d'establir l'existència clarament diferenciada de dues poblacions dominants de

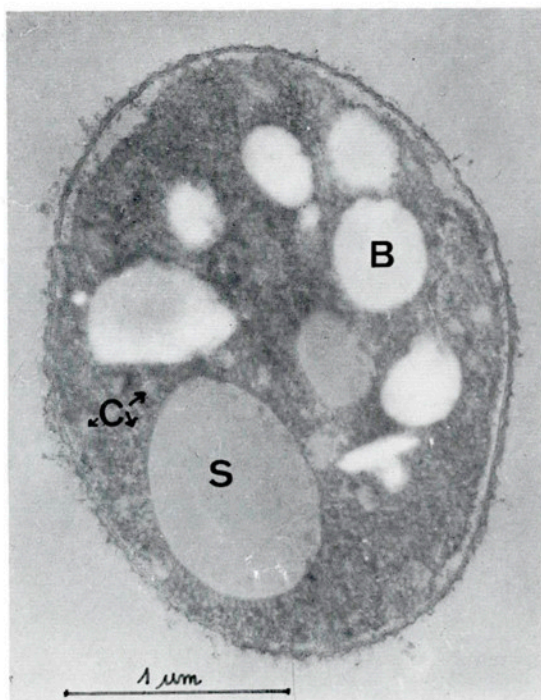


FIG. 1. — Secció ultrafina de *Chromatium minus* mostrant inclusions de poli- β -hidroxibutirat (B), grànuls de sofre (S) i cromatòfors (C) repartits pel citoplasma.



FIG. 2. — Micrografia electrònica de «scanning» mostrant cèl·lules de *Chromatium* (òvals grans) i nombroses cèl·lules de *Chlorobium limicola* (bacils rectes) i de *Chlorobium phaeovibrioides* (bacils corbats).

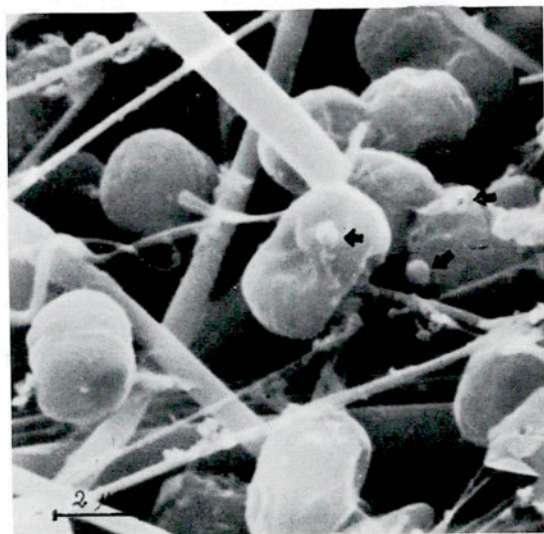


FIG. 3. — Micrografia electrònica de «scanning» de *Chromatium minus* amb altres bacteris epibionts (indicats per fletxes) adherits a la paret cel·lular del primer.

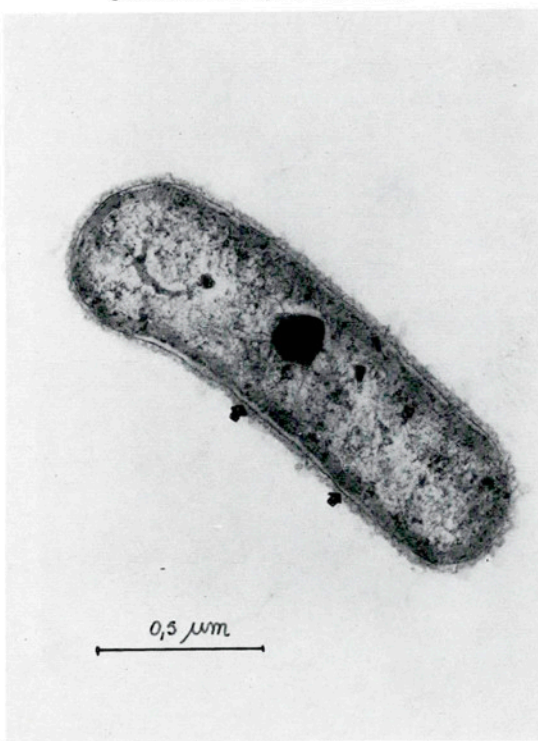


FIG. 4. — Secció ultrafina de *Chlorobium limicola*. S'aprecien els «chlorosomes» (alguns d'ells indicats per fletxes) densament tenyits i disposats paral·lelament a la membrana citoplasmàtica.



FIG. 5.—Morfologia comparada de les dues espècies de *Chlorobium* descrites en el text. Els bacils rectes que acaben de dividir-se són *C. limicola*. El bacil corbat (vibri) és *C. phaeovibrioides*. (Tinció negativa amb àcid fosfotúngstic.)

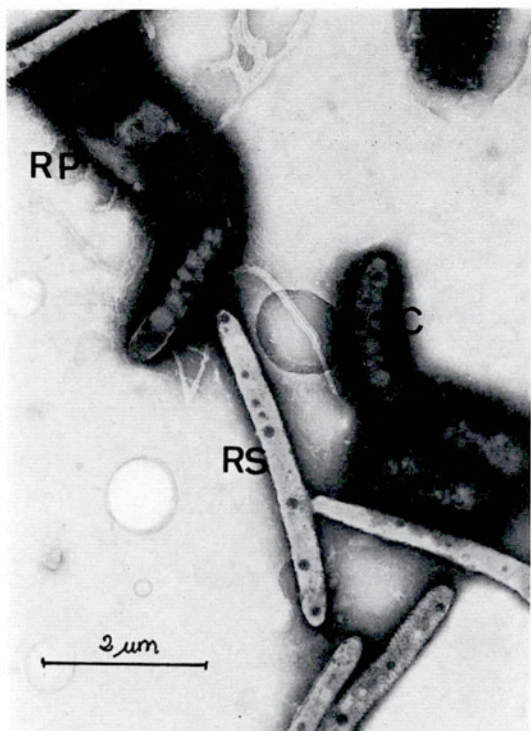


FIG. 6.—Micrografia electrònica d'una mostra d'aigua de l'estanyol de Sisó en la que poden observar-se una cèl·lula de *Rhodopseudomonas* (RP), quatre de *Rhodospirillum* (RS) i alguns *Chlorobium* (C). (Tinció negativa amb àcid fosfotúngstic.)

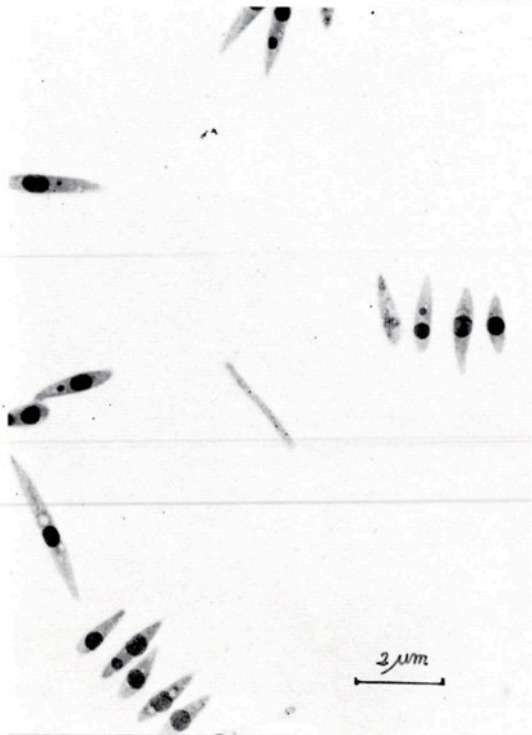


FIG. 7.—Bacteris fusiforms o piriforms de disposició paral·lela amb una o dues inclusions centrals molt denses als electrons. (Tinció negativa amb àcid fosfotúngstic.)



FIG. 8.—Cèl·lules bacil·lars amples de disposició paral·lela trobades en rars ocasions a l'estanyol de Sisó. (Tinció negativa amb àcid fosfotúngstic.)

bacteris fotosintètics: (1) la població formada per una sola espècie de la família Cromatiàcies i (2) la constituïda per dues espècies de la família Clorobiàcies.

El color de les aigües, vermelles en determinades èpoques de l'any i verd-negres en altres, denoten la predominància d'una o l'altra d'aquestes poblacions. La identificació de les espècies ha estat realitzada per les seves característiques morfològiques i d'ultraestructura, tenint en compte l'espectre d'absorció dels seus pigments.

Chromatium minus

L'examen al MET per tinció negativa, així com les observacions efectuades amb microscòpia electrònica de «scanning», revelen que es tracta d'un bacil ovoide dotat de dos flagels polars. La seva mida és de 2 μm d'amplada i 2,5 a 5 μm de longitud, corresponent aquest últim valor a les fases de divisió cel·lular. Les seccions ultrafines manifesten l'existència de vesícules fotosintètiques intracitoplasmàtiques de 40 a 50 nm on es localitzen els pigments, bacterioclorofilla *a* i carotenoids de la sèrie okenona.

En la figura 1 pot observar-se que repartits uniformement pel citoplasma bacterià es troben grànuls de sofre de mida variable molt densos als electrons (grànuls foscos). Segons SCHMIDT *et al.* (1971) i NICOLSON i SCHMIDT (1971) aquests grànuls contenen un 93 % de sofre elemental, 5 % de proteïna i 0,6 % de lípids. L'estudi de diferents cèl·lules d'una mateixa població, i de diferents poblacions al llarg del temps, posa de manifest que el nombre de grànuls de sofre és variable.

En la figura 1 s'observa un altre tipus d'inclusions, en nombre més gran (grànuls blancs), que hem identificat com de poli- β -hidroxibutirat mitjançant el mètode de BURDON recollit per PELCZAR (1957). El nombre i mida d'aquests és també variable i possiblement depèn de l'estat fisiològic del microorganisme. Ambdós tipus d'inclusions ocupen una bona part de l'espai citoplasmàtic.

L'espècie estudiada fou classificada tentativament com a *Chromatium minus* atenent a les característiques esmentades i al fet de contenir com a pigment carotenoid l'okenona.

La morfologia i mides relatives de *Chromatium minus* poden observar-se en les microfotografies obtingudes mitjançant el microscopi electrònic de «scanning» (fig. 2), especialment en relació a les altres dues espècies dominants a l'estanyol de Sisó. Tal com palesa la figura 2, les cèl·lules més grans corresponen a *Chromatium minus*, els bacils rec-

tes petits a *Chlorobium limicola* i les cèl·lules corbades (vibris) a *Chlorobium phaeovibrioides* (vegeu més endavant).

En un nombre elevat de casos, es detectà adosat a la paret de *Chromatium* un epibiont encara no identificat, de morfologia esfèrica i lleugerament corbada, i d'una mida que oscilla entre 0,3-0,5 μm de diàmetre i 0,5-0,8 μm de llargada (fig. 3).

Chlorobium limicola

La tinció negativa en el MET revela que es tracta d'un bacil d'extrems arrodonits (fig. 4). Té d'ample 0,6 μm , i de llarg 1,5 a 2,5 μm les cèl·lules individuals i 3,9 a 4,3 μm les cèl·lules en divisió. No presenta flagels i freqüentment forma cadenes. Els talls ultrafins indiquen l'existència de «clorosomes» («vesícules de *Chlorobium*»), amb membranes no unitàries de 30-120 nm disposades paral·lelament a la membrana citoplasmàtica; entre ambdues classes de membranes sembla no haver cap connexió. OELZE i DREWS (1971) indiquen que la disposició d'aquestes estructures, així com la seva forma, són bastant constants, i per tant el seu estudi té valor taxonòmic. Dins d'aquestes vesícules típiques es troben els pigments fotosintètics: bacterioclorigilla *c* i carotenoids derivats del γ -carotè (clorobactè). Segons han demostrat BROCH-DUE *et al.* (1978) la mida d'aquestes vesícules varia en funció de la intensitat de llum rebuda.

Chlorobium phaeovibrioides

Les cèl·lules individuals són corbades, en forma de vibri, amb una amplada mitja de 0,8 μm i una llargada de 1,43 μm . La figura 5 mostra la morfologia d'aquesta espècie comparada amb *C. limicola*. Els pigments clorofil·lics corresponen a bacterioclorigilla *d*, però els carotenoids són derivats del β -carotè (iso-renieratè). Les microfotografies també revelen l'existència de clorosomes. Ambdues espècies de *Chlorobium* són gramnegatives, immòbils, sense grànuls de sofre i viuen en ambients anaeròbics en aigües que continguin una elevada concentració de H_2S i exposades a la llum.

Volum celular

A la taula 1 es presenta el volum promig de cadascuna de les tres espècies dominants esmentades. Han estat calculats suposant una forma aproximada de cilindre tancat per dos semiesferes.

TAULA 1.—Dimensions promig de les tres espècies bacterianes dominants a l'estanyol de Sisó

	Amplada (μm)	Longitud (μm)	Volumen (μm^3)
<i>Chromatium minus</i>	2,50	3,50	25,36
<i>Chlorobium limicola</i>	0,62	2,41	0,84
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	0,44	1,88	0,32

Altres espècies identificades

De manera ocasional, i sempre amb molt poca abundància, foren detectats bacteris pertanyents a la família Rodospiralàcies. Per la seva morfologia i pigments s'identificaren com corresponents al gènere *Rhodopseudomonas* i *Rhodospirillum*. En la fotografia 6 s'observa una cèl·lula de *Rhodopseudomonas* (RP), de morfologia de bacil ovoidal ample i molt densa als electrons, a més de quatre *Rhodospirillum* (RS), allargats, amb inclusions múltiples i menys denses als electrons. [En la mateixa fotografia hom pot veure diferents *Chlorobium* (C)]. Les cèl·lules de *Rhodopseudomonas* són bacils ovoidals de 0,6-0,9 μm d'ample i 1,2-2 μm de llarg; presenten reproducció típica per gemes i els pigments (bacterioclorofil·la *a* i carotenoids) estan allotjats en lamelles. *Rhodospirillum* té cèl·lules corbades o espiralades de $0,4 \times 4 \mu\text{m}$ amb bacterioclorofil·la *a* i carotenoids.

Microorganismes no identificats

Cap al mes d'octubre de 1977 hom trobà a la superfície de l'estanyol de Sisó grups de bacteris fusiforms o piriforms formant una disposició paral·lela característica (fig. 7). Les cèl·lules individuals tenien una amplada de 0,4 μm i una longitud de 1,7-3,5 μm . Al setembre del mateix any havien estat detectats grups de cèl·lules bacillars amples de 0,6 μm d'amplada i 5,3 μm de longitud disposades també paral·lelament (fig. 8). Cal destacar l'analogia d'aquest últim grup amb el descrit per CALDWELL i TIEDJE (1974) a l'hipolimnion de dos llacs de Michigan.

Per últim, hom ha trobat en diferents ocasions cèl·lules quasi esfèriques com a constituents importants de la població bacteriana.

Recomptes bacterians i estima de la biomassa celular

Els recomptes realitzats per microscòpia òptica i electrònica de transmissió de les mostres obtingudes a 0,5 m de fondària s'indiquen a la taula 2.

TAULA 2. — Recomptes comparatius entre microscòpia òptica (MO) i electrònica de transmissió (ME) de les tres espècies bacterianes predominants a l'estanyol de Sisó. Les dades (nombre de cèl·lules per mililitre) corresponen a mostres preses a 0,5 m de fondària en quatre èpoques del cicle anual.

Espècie	Hivern (28-2-78)		Primavera (20-5-78)		Estiu (23-8-78)		Tardor (18-11-78)	
	MO	ME	MO	ME	MO	ME	MO	ME
<i>Chromatium minus</i>	$4,1 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$3,1 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
<i>Chlorobium limicola</i>	$9,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$8,6 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	$5,6 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	—	$2,0 \times 10^5$	—	$6,6 \times 10^5$	—	$3,1 \times 10^6$	—	$5,8 \times 10^5$

En els resultats obtinguts per microscòpia electrònica s'aprecia que els recomptes resulten inferiors als obtinguts per microscòpia òptica. Possiblement, i tal com s'ha indicat en la introducció, pot ésser degut a la manipulació més complexa de les mostres. Malgrat aquest inconvenient, és obvi que el gran poder resolutiu del microscopi electrònic permet calcular les freqüències relatives de les diferents espècies observades amb una més gran precisió.

DISCUSSIÓ

Els estudis portats a terme de manera sistemàtica al llarg de dos anys a l'estanyol de Sisó posen de manifest que la distribució de les poblacions bacterianes obeeix a la variació dels principals paràmetres físico-químics. D'acord amb GUERRERO i ABELLÀ (1978), els dos gèneres de bacteris fotosintètics dominants segueixen estratègies diferents. Així, *Chromatium*, pel fet de ser capaç de desplaçar-se molt activament, pot buscar dins la columna d'aigua la situació idònia referent a concentració de H_2S i intensitat de llum. *Chlorobium*, degut a la seva immobilitat, necessàriament ha d'adaptar-se als canvis de concentració de H_2S i intensitat de llum. *Chromatium* predomina quan la concentració de H_2S està situada entre 2-40 mg/l; *Chlorobium* és dominant quan la concentració de H_2S és superior a 50 mg/l.

Els recomptes efectuats amb el microscopi electrònic han permès una millor precisió en la identificació de les espècies dominants. Els valors donats indistintament per a *Chlorobium* pel microscopi òptic

han estat desglosats d'una manera més específica per microscòpia electrònica. Igualment, per aquest últim procediment hom ha avaluat poblacions que en determinats moments arribaren a ser part important de la població bacteriana, però que per la seva escasa concentració no van ser detectades per microscòpia òptica. Així mateix, la presència d'epibionts adherits a la paret de *Chromatium* tant sols es va detectar en microfotografies electròniques. Volem destacar la importància d'aquest fet donada la pressió selectiva que certes formes de parasitisme poden exercir sobre les poblacions naturals. Finalment, és factible de realitzar acuradament la determinació del volum mig de les espècies amb objecte de calcular la biomassa bacteriana.

Com a dificultats annexes a la microscòpia electrònica, assenyalem les que fan referència a l'obtenció i preparació de les mostres, les quals inclouen (1) recollecció, (2) fixació i (3) tinció:

(1) Els millors resultats han estat obtinguts recollectant les mostres protegides de la llum i de l'oxigen i conservant-les a 4 °C fins a la seva utilització. D'aquesta manera s'evita la tendència observada en *Chromatium minus* de formar agregats, la qual cosa dificulta tant el recompte poblacional com la identificació de la resta d'espècies. Ignorem si l'esmentada tendència està provocada pels colorants emprats en microscòpia electrònica, o bé es tracta d'una protecció a la llum o a la tensió d'oxigen, ja que en principi les mostres eren exposades a aquests factors en ésser tractades per a la posterior observació.

La pèrdua de motilitat i la consegüent formació d'agregats emboïcats en llims, pròpia de *Chromatium* quan les condicions li són adverses, ha estat descrita per PFENNIG (1967).

(2) Les fixacions habituals amb formaldehid provoquen freqüentment precipitats de difícil eliminació. Per tant, proposem una ràpida preparació de les mostres que eviti qualsevol tipus de fixació.

(3) Les tincions amb àcid fosfotúngstic al 1% (pH 7,2) donen imatges més contrastades i revelen en ocasions inclusions internes. L'acetat d'uranil dona pitjors resultats, sobretot en ésser utilitzat per a la identificació de poblacions de *Chromatium*, les quals apareixen com a masses denses als electrons de difícil caracterització.

Pels talls ultrafins, el mètode de RYTER-KELLEMBERGER, utilitzant amortidor fosfat, revela amb millor nitidesa les estructures internes. La tinció dels talls amb citrat de plom durant 20 minuts fou insuficient per a contrastar clarament les vesícules de *Chlorobium*. En canvi, l'absència d'aquest colorant no impedí que quedessin contrastades la paret i vesícules fotosintètiques de *Chromatium*.

De tot el treball exposat, hom conclou que les tècniques de microscòpia electrònica aplicades als estudis de les aigües naturals permeten

tant una millor caracterització de les espècies com un més ampli coneixement de la seva ultraestructura. Els treballs previs sobre la influència que els paràmetres físico-químics tenen sobre la dinàmica poblacional podran ser completats amb l'estudi dels canvis haguts a nivell estructural. En conseqüència, la microscòpia electrònica aporta una nova visió que amplia el camp dels actuals coneixements de l'ecologia bacteriana.

Agraïments

Les micrografies electròniques de «scanning» han estat efectuades al Servei de Microscòpia de l'Institut d'Investigacions Pesqueres, C.S.I.C. Agraïm especialment al director de l'Institut, Dr. Buenaventura Andreu Morera, i al tècnic del Servei, senyor Antoni Fauquet Andreu, totes les facilitats prestades.

BIBLIOGRAFIA

1. BOWDEN, W. B. — *Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria.* «Appl. Environ. Microbiol.» 33: 1229-1232 (1977).
2. BROCH-DUE, M., ORMEROD, G. i FJERDINGEN, B. S. — *Light intensity on vesicle formation in Chlorobium.* «Arch. Microbiol.» 116: 269-272 (1978).
3. CALDWELL, D. E. i TIEDJE, J. M. — *A morphological study of anaerobic bacteria from the hypolimnia of two Michigan lakes.* «Can. J. Microbiol.» 21: 362-376 (1975).
4. DUBINIA, G. A. i KUZNETSOV, S. I. — *The ecological and morphological characteristics of microorganisms in Lesnaya Lamba (Karelia).* «Int. Rev. gesamten Hydrobiol.» 61: 1-19 (1976).
5. GLAUERT, A. M. i GLAUERT, R. H. — *Araldite as an embedding medium for electron microscopy.* «J. Biophys. Biochem. Cytol.» 4: 409-419 (1958).
6. GUERRERO, R. i ABELLÀ, C. — *Dinàmica espacio-temporal de las poblaciones bacterianas fotosintéticas en una laguna anaerobia de aguas sulfurosas.* «Oecol. aquatica», 3: 193-205 (1978).
7. KELLENBERGER, E., RYTER, A. i SECHAUD, J. — *Electron microscope study of DNA-containing plasmids. II. Vegetative and nature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states.* «J. Biophys. Biochem.» 4: 671-684 (1958).
8. LARSSON, K., WEIBULL, C. i CRONBERG, G. — *Comparison of light and electron microscopic determinations of the number of bacteria and algae in lake water.* «Appl. Environ. Microbiol.» 35: 397-404 (1978).
9. NICOLSON, G. L. i SCHMIDT, G. L. — *Structure of the Chromatium sulfur particle and its protein membrane.* «J. Bacteriol.» 105: 1142-1148 (1971).
10. OELZE, J., i DREWS, G. — *Membranes of photosynthetic bacteria.* «Biochim. Biophys. Acta», 265: 209-239 (1972).
11. PELCZAR, M. J. — *Manual of microbiological methods.* (Society of American Bacteriologists). McGraw-Hill, New York. (p. 30) (1957).
12. PFENNIG, N. — *Photosynthetic bacteria.* «Annu. Rev. Microbiol.» 21: 285-324 (1967).
13. REYNOLDS, E. S. — *The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy.* «J. Cell. Biol.» 17: 208-221 (1963).
14. SCHMIDT, G. L., NICOLSON, G. L. i KAMEN, M. D. — *Composition of the sulfur particle of Chromatium vinosum strain D.* «J. Bacteriol.» 105: 1137-1141 (1971).
15. WATSON, S. W., NOVITSKY, T. Y., QUINBY, H. L., i VALOIS, F. W. — *Determination of bacterial number and biomass in the marine environment.* «Appl. Environ. Microbiol.» 33: 940-946 (1977).