



Universitat de Girona

HETEROGENEÏTAT PIGMENTÀRIA EN BACTERIS FOTOSINTÈTICS VERDS: FISIOLOGIA I SIGNIFICACIÓ ECOLÒGICA

Carles BORREGO i MORÉ

Dipòsit legal: Gi. 1880-2012

<http://hdl.handle.net/10803/96755>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona
Institut d'Ecologia Aquàtica

Tesi Doctoral

**HETEROGENEÏTAT PIGMENTÀRIA EN
ELS BACTERIS FOTOSINTÈTICS VERDS.
FISIOLOGIA I SIGNIFICACIÓ ECOLÒGICA**

Carles Borrego Moré

1996



Universitat de Girona
Biblioteca



Universitat de Girona
Institut d'Ecologia Aquàtica

HETEROGENEÏTAT PIGMENTÀRIA EN ELS BACTERIS FOTOSINTÈTICS VERDS. FISIOLOGIA I SIGNIFICACIÓ ECOLÒGICA

Memòria redactada per a optar al Grau de Doctor en
Ciències Biològiques, per la Universitat de Girona, per

Carles Borrego Moré

Vist-i-plau
El Director de la Tesi

Dr. L.J. Garcia-Gil
Professor Titular de Microbiologia

Girona, juliol de 1996

AGRAÏMENTS

El que això subscriu té, modestament, dues vides. L'una m'ha permès realitzar aquesta memòria, l'altra m'ha ajudat a desconnectar quan era necessari. Per sort, tot i que coexisteixen en el temps, he aconseguit no mesclar-les en l'espai. Des d'aquest punt de vista, aquestes ratlles volen servir per deixar fluir aquests dos "jo" perquè expressin, lliurement i per separat, la seva gratitud.

Agraïments de la primera vida: És aquesta una vida d'obligat recull, de laboratori i biblioteca. Una vida que cansa i esgota però que alhora apassiona.

"Sota la mampara verda de les taules de la biblioteca, les prestatgeries plenes de llibres foscos i severs, s'hi està bé. Però la vida és molt lluny d'ací. La vida és aquest soroll remot, sord –com la fressa de la mar–, que m'arriba a través dels vidres d'aquests balcons tancats."

Josep Pla, "El quadern gris"

En primer lloc, el meu agraïment més sincer al Dr. Jesús Garcia-Gil pel seu mestratge i recolzament inesgotable en totes les fases de realització d'aquesta tesi, que és tant meva com seva. Gràcies per entusiasmar-te tant com jo amb els homòlegs.

Vull agrair als companys de la unitat de Microbiologia la seva ajuda constant, tant en el camp professional com en l'humà. Són infinits els agraïments per tots ells: el Dr. Carles Abellà, en Ramon Brunet, la Dra. Imma Pibernat (encara ets dels nostres!), la Dra. Asunción Martínez (a la qui agraeixo especialment la seva paciència i generositat pel que fa la realització i cessió de les fotografies al microscopi electrònic), en Lluís Bañeras (tants i tants mostratges, esforços i afanys!), en Xavi Vila, en Jordi Figueras (per aguantar-me les neures de tesi en un espai tant reduït com el nostre despatx), en Xevi Cristina, en Javi Rodríguez, l'Anna Maria Aymerich i la Núria Cabezas. Tots ells mereixerien més espai i temps, però espai no en tinc i temps me'n falta. Per tant, moltes gràcies.

També tinc agraïments interdisciplinars, que van dirigits als companys de la Unitat de Física (especialment a en Jordi Colomer, company de viatge); de la Unitat de Bioquímica (la Dra. Maria Vilanova, en Marc Ribó i la M^a Gràcia Coll, no m'oblido els primers consells i ensenyances en el món del HPLC); de la Unitat de Química Orgànica, Inorgànica i Analítica (la Sara, la Marta, la Montse, l'Eduard, en Toni, i especialment en Juanma, que em van ajudar a ressoldre tots els meus dubtes químics); i de la Unitat de Geologia (l'Ignasi, en David i en Carles, que mai han tingut un *no* alhora de deixar-me utilitzar el seu ordinador). Finalment, no vull deixar d'agrair l'ajuda de la Teresa Roura i l'Olga Corral, ja que amb els seus somriures aconsegueixen fer més humans i agradables els freds i impersonals tràmits administratius.

Finalment, un record pels companys del llunyà nord, que em van acollir amb una calidesa xocant amb la cruessa del clima danès. *Jeg vil gemme takke Dr. Mette Miller og Dr. R.P.Cox for deres gode råd, stakke og gode diskussioner omkring mit arbejde på Biokemist Institut på Odense Universitet. Uden deres hjælp ville tepidum kapitel nok aldrig vare blevet skrevet. Jeg er også stor tak skyldig til resten af medlemmerne i Foto-gruppen (NUF, Dorte, Christine, Bent, Bo, Suzanne, Birgitte, Karen, Jack, Yvette, Claus, Mette P., Kirsten, Nick, Kim, and Jen Jørgen Lønsman) for deres venlige og tålmodige måde af hjælpe frå (Ved du hvor jeg kan finde...?). Tak for jeres hyggelige måde at vare frå. Skål. (Excuse me if there is some orthographical mistakes in the text but Jack's scripture is very hard to decode).*

Agraïments de la segona vida: És aquesta una vida dissoluta, de festa i "jarana". Una vida que no cansa però que consumeix i apassiona.

" Després d'una infinitat de declamacions humanitàries i cordials, tornem a la matinada –una matinada fina, filtrada, de pell de seda, cel de color d'absenta sobre el qual es detallen les coses amb un sintetisme d'estampa. El ventet de la terra és viu i ens aclareix el cap. Ara seria el moment, potser, de parlar una estona amb una dona malcasada, avinent, generosa i amable."

Josep Pla, "El quadern gris"

Aquest "Jo" vol agrair a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han contribuït a que desconectés de la vida primera i m'alliberés de la cotilla científica que molts no saben descondar. Des d'aquí agraeixo als col·legues de Sant Feliu (GBC) tantes i tantes nits de copes i riures. No els puc nombrar però tothom sap qui són. També vull afegir-hi aquí a en Catxo i l'Elena, en Lluís i la Montse, l'Emilio Ortega i en Pep Màdico (ja en quedem pocs de tants com erem!).

Finalment, només em resta agrair als meus pares i als seus pares, per recolzar-me i donar-me l'oportunitat de ser on sóc. És per ells i per la Sònia el meu darrer agraïment. Gràcies per estimar i comprendre les meves dues vides per igual.

ABREVIATURES NO CONVENCIONALS

- BCl:** Bacterioclorofil.la
BCl_F: Bacterioclorofil.la esterificada amb farnesil
[E, M] BCl_F: 8-etil, 12-metil Bacterioclorofil.la esterificada amb farnesil
BCIs: Bacterioclorofil.les
β-Isr: beta-Isorenieratè
Car: Carotenoides
Cbt: Clorobactè
CD: Canal de detecció
Cl: Clorofil.la
CR: Centre de reacció
CRH: Contingut relatiu d'homòlegs
CRHS: Contingut relatiu d'homòlegs secundaris
E: Etil
Esp: Espiril.loxantina
F: Farnesil
FMO: Proteïnes Fenna-Matthews-Olson
I: Isobutil
Isr: Isorenieratè
Lcp: Licopè
M: Metil
N: neo-Pentil
Nrp: Neurospore
OH-Cbt: Hidroxi-clorobactè
Okn: Okenona
Pr: Propil
Rdp: Rodopina
Rpl: Rodopinal
T_r: Temps de retenció

LLISTAT DE TAULES

Capítol 1. Introducció

Taula 1.1. Principals característiques de les bacterioclороfil·les.....	6
Taula 1.2. Principals característiques dels bacteris verds del sofre	9
Taula 1.3. Principals carotenoides dels bacteris verds del sofre	13

Capítol 2. Material i Mètodes

Taula 2.1. Soques de bacteris fotosintètics utilitzades en l'estudi	22
Taula 2.2. Màxims d'absorció dels principals pigments fotosintètics	26
Taula 2.3. Longituds d'ona per l'enregistrament de cromatogrames	32
Taula 2.5. Localització geogràfica dels llacs i estanyols estudiats	43

Capítol 3. Aplicació de la tècnica de HPLC en l'anàlisi de pigments fotosintètics bacterians

Taula 3.1. Temps de retenció dels diferents pigments	54
Taula 3.2. Variacions en el CRH en diferents soques de bacteris verds del sofre	62
Taula 3.3. Comparació del nombre d'homòlegs amb diferents mètodes de HPLC	64

Capítol 4. Fisiologia de l'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum

Taula 4.1. Principals paràmetres de creixement per les diferents soques	73
Taula 4.2. Màxims d'absorció i amplades de la banda Q_y	75
Taula 4.3. Continguts específics dels diferents pigments	76
Taula 4.4. CRH als cultius control i inòculs	80
Taula 4.5. Màxims d'absorció Q_y en els cultius de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	84
Taula 4.6. Continguts específics dels diferents pigments en els cultius de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	85
Taula 4.7. CRH en els cultius de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	85
Taula 4.8. Principals paràmetres de creixement dels cultius de <i>C. tepidum</i>	89
Taula 4.9. Màxims d'absorció, amplada de la banda Q_y i màxim d'emissió de fluorescència dels cultius i fraccions de <i>Chlorobium tepidum</i>	93
Taula 4.10. Continguts específics de pigments a <i>Chlorobium tepidum</i>	93
Taula 4.11. Composició de carotenoides de les cèl·lules i fraccions fotosintètiques dels cultius de <i>Chlorobium tepidum</i>	98

Capítol 5. Variacions dels pigments antena en poblacions naturals de Clorobiàcies

Taula 5.1. Coeficients d'extinció de la llum a C-III, C-IV i el Coromina	120
Taula 5.2. Principals característiques físico-químiques dels diferents llacs centreeuropeus i nord-americans estudiats	128
Taula 5.3. Principals característiques biològiques dels diferents llacs centreeuropeus i nord-americans estudiats	134
Taula 5.4. Temps de retenció dels principals homòlegs de la BCl d , d' i d''	152
Taula 5.5. Sobreestimació resultant de la determinació espectrofotomètrica de les concentracions reals de les diferents BCl en mostres naturals	162
Taula 5.6. Desplaçament del màxim Q_y de la BCl e en les poblacions de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> de C-III i C-IV	171

LLISTAT DE FIGURES

Capítol 1. Introducció

Figura 1.1. Estructura química de les diferents bacterioclороfil·les	7
Figura 1.2. Estructura química de la BCl c; eixos de transició i espectre d'absorció	8
Figura 1.3. Estructura aparell fotosintètic	11

Capítol 2. Material i Mètodes

Figura 2.1. Comparació estructural i espectral de la Cl b i les BCl di e.....	29
Figura 2.2. Instrumental HPLC i característiques	31
Figura 2.3. Programa de gradient i ordre d'elució	33
Figura 2.4. Gràfic de contorns i representació tridimensional	34
Figura 2.5. Rectes patrons dels diferents pigments amb HPLC	36
Figura 2.6. Localització i batimetria de les cubetes estudiades	39
Figura 2.7. Batimetria estanyol Coromina	40
Figura 2.8. Sistema de mostreig utilitzat	44

Capítol 3. Aplicació de la tècnica de HPLC en l'anàlisi de pigments fotosintètics bacterians

Figura 3.1. Estructures dels principals homòlegs de les BCl c, di e.....	50
Figura 3.2. Utilitat del parell iònic en la separació dels pigments amb HPLC	52
Figura 3.3. Cromatogrames de diferents soques de bacteris verds del sofre	53
Figura 3.4. Espectres d'absorció dels diferents homòlegs de les BCl c, di e	56
Figura 3.5. Cromatogrames pigments de <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	58
Figura 3.6. Cromatogrames pigments de <i>Chromatium minus</i>	59
Figura 3.7. Cromatogrames pigments de <i>Heliobacillus mobilis</i>	60

Capítol 4. Fisiologia de l'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum

Figura 4.1. Espectres lumínics de la font de llum utilitzada	71
Figura 4.2. Efecte de la intensitat de llum en la taxa de creixement de les diferents espècies estudiades	72
Figura 4.3. Classificació de les intensitats de llum assajades d'acord amb la taxa de creixement de les espècies estudiades	74
Figura 4.4. Cromatogrames de les espècies verdes incubades a les diferents intensitats de llum.....	77
Figura 4.5. Cromatogrames de les espècies marrons incubades a les diferents intensitats de llum.....	78
Figura 4.6. Variacions en el CRH en les diferents espècies.....	81
Figura 4.7. Corbes de creixement de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> a les diferents intensitats de llum.....	83
Figura 4.8. Eficiència fotosintètica de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> a les diferents intensitats de llum.....	83
Figura 4.9. Variacions en el CRH de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> durant el creixement.....	86
Figura 4.10. Variacions en el CRHS i la biomassa de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> durant el creixement.....	87
Figura 4.11. Efecte de la intensitat de llum en la taxa de creixement de <i>Chlorobium tepidum</i>	89

Figura 4.12. Distribució de les fraccions en els gradients de sacarosa.....	90
Figura 4.13. Espectres d'absorció <i>in vivo</i> dels cultius de <i>Chlorobium tepidum</i>	91
Figura 4.14. Espectres d'absorció <i>in vivo</i> dels clorosomes i les membranes de <i>Chlorobium tepidum</i>	92
Figura 4.15. Espectres d'emissió de fluorescència dels clorosomes i les membranes de <i>Chlorobium tepidum</i>	94
Figura 4.16. Cromatogrames de <i>Chlorobium tepidum</i> a les diferents intensitats de llum	96
Figura 4.17. Variacions en el CRH de <i>Chlorobium tepidum</i> a les diferents intensitats de llum	97
Figura 4.18. Relació continguts específics BCl <i>e</i> i BCl <i>a</i> a <i>C. phaeobacteroides</i>	101
Figura 4.19. Relació continguts específics BCl <i>e</i> i Isr a <i>C. phaeobacteroides</i>	103
Figura 4.20. Relació continguts específics BCl <i>e</i> i a <i>C. tepidum</i>	103
Figura 4.21. Relació entre l'increment del màxim Q_y i el CRH	106
Figura 4.22. Hipòtesi d'optimització del complex antena mitjançant l'enriquiment en homòlegs alquilats	108

Capítol 5. Variacions dels pigments antena en poblacions naturals de bacteris fotosintètics verds

Figura 5.1. Distribució espàcio-temporal dels paràmetres físico-químics a C-III.....	116
Figura 5.2. Localització de la quimioclina i la interfase O_2/H_2S a C-III i C-IV.....	118
Figura 5.3. Perfils d'extinció vertical de la llum a C-III, C-IV i al Coromina	119
Figura 5.4. Distribució espàcio-temporal dels paràmetres físico-químics a C-IV	121
Figura 5.5. Distribució espàcio-temporal dels paràmetres físico-químics al Coromina	124
Figura 5.6. Distribució espàcio-temporal de la concentració de Cl <i>a</i> al Coromina	126
Figura 5.7. Comunitat microbiana a C-III i C-IV.....	130
Figura 5.8. Comunitat microbiana a l'estanyol Coromina	132
Figura 5.9. Comunitat microbiana a diferents llacs de EEUU	135
Figura 5.10. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl <i>a</i> a C-III.....	136
Figura 5.11. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Okn a C-III.....	137
Figura 5.12. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl <i>e</i> a C-III.....	138
Figura 5.13. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Isr a C-III	139
Figura 5.14. Perfils verticals de l'índex Car/BCl a C-III i C-IV durant 1994.....	140
Figura 5.15. Perfils verticals de l'índex Car/BCl a C-III i C-IV durant 1995.....	140
Figura 5.16. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl <i>a</i> a C-IV.....	141
Figura 5.17. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Okn a C-IV	142
Figura 5.18. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl <i>e</i> a C-IV	143
Figura 5.19. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Isr a C-IV.....	144
Figura 5.20. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl <i>c</i> i <i>d</i> a l'estanyol Coromina	146
Figura 5.21. Patrons cromatogràfics de la BCl <i>e</i> en soques de laboratori i poblacions naturals d'espècies marrons	148
Figura 5.22. Patrons cromatogràfics de la BCl <i>d</i> i <i>d'</i> en poblacions naturals.....	150
Figura 5.23. Patrons cromatogràfics de la BCl <i>d'</i> i <i>d''</i> en poblacions naturals	151
Figura 5.24. Distribució espàcio-temporal del CRH de BCl <i>e</i> ₄ a C-III	153
Figura 5.25. Evolució de la concentració integrada d'homòlegs de la BCl <i>e</i> a C-III.....	154
Figura 5.26. Distribució vertical del CRHS a C-III i C-IV durant 1994	155
Figura 5.27. Distribució vertical del CRHS a C-III i C-IV durant 1995	155
Figura 5.28. Distribució espàcio-temporal del CRH de BCl <i>e</i> ₄ a C-IV	156
Figura 5.29. Evolució de la concentració integrada d'homòlegs de la BCl <i>e</i> a C-IV.....	157
Figura 5.30. Distribució espàcio-temporal del CRH de BCl <i>d</i> ₁ i <i>d</i> ₃ al Coromina.....	158

Figura 5.31. Evolució de la concentració integrada dels homòlegs de la BCl <i>d'</i> a l'estanyol Coromina.....	159
Figura 5.32. Rectes de regressió entre la concentració real de pigment (HPLC) i la concentració mesurada a l'espectrofotòmetre	161
Figura 5.33. Distribució vertical de les concentracions dels diferents pigments mesurades amb HPLC i espectrofotometria.....	163
Figura 5.34. Distribució vertical de patrons cromatogràfics dels homòlegs de la BCl <i>e</i> en poblacions naturals	166
Figura 5.35. Presència de BCl <i>e</i> ₁ en soques de laboratori d'espècies marrons	167
Figura 5.36. Evolució concentració integrada homòlegs secundaris a C-III i C-IV	168
Figura 5.37. Evolució índex BCl <i>e</i> _p /BCl <i>e</i> _{total} a C-III i C-IV a C-III i C-IV	169
Figura 5.38. Distribució dels CRH en poblacions naturals obtinguda amb l'anàlisi de components principals. Dendrograma de similitut	173
Figura 5.39. Patrons cromatogràfics per cadascun dels grups obtinguts amb el PCA.....	174

Capítol 6. Discussió General

Figura 2.1. Mecanismes per l'adaptació pigmentària dels bacteris fotosintètics verds a les baixes intensitats de llum	180
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

RESUM

Els bacteris verds posseeixen un dels sistemes antena més complexos dins del grup dels microorganismes fotosintètics. Una de les raons d'aquesta complexitat és l'elevada diversitat de pigments antena, especialment pel que fa a les bacterioclorofil·les (BCLs *c*, *d* o *e*). Cadascuna d'aquestes BCLs, que tenen diferents estructures i propietats òptiques, es compon d'una mescla de diverses formes homòlogues disposades ordenadament a l'interior de les unitats antena (clorosomas). Aquesta diversitat pigmentària dificulta enormement l'anàlisi i identificació d'aquests pigments mitjançant les tècniques espectrofotomètriques tradicionals.

Per a solucionar aquest problema s'ha dissenyat un mètode de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) que permet separar les diferents BCLs i els seus corresponents homòlegs. L'anàlisi cromatogràfica va revelar dos grups d'homòlegs: un primer grup ($T_r = 23-31$ min) format per quatre homòlegs esterificats amb farnesol, i un segon, ($T_r = 34-40$ min), quantitativament menys important i en el que es van agrupar diversos homòlegs secundaris, el nombre dels quals varia en funció de l'espècie analitzada i del seu estat fisiològic. A més, el mètode permet la separació d'una gran diversitat de pigments fotosintètics, tant bacterians (BCL *a*, BCL *g*, clorobactè, isorenieratè, okenona) com algals (Cl *a*, α i β -carotè, etc).

L'anàlisi cromatogràfica d'extractes pigmentaris de diverses soques de laboratori de bacteris verds del sofre va revelar que el contingut relatiu dels quatre homòlegs principals (CRH) és extremadament variable. El fet que aquesta variabilitat estigués més relacionada amb aspectes fisiològics del cultiu que no pas amb la seva taxonomia, juntament amb la disparitat d'aquests patrons pigmentaris amb els obtinguts en mostres naturals, va portar a investigar el paper dels diferents homòlegs de les BCLs en l'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum. Amb aquest objectiu, es van analitzar les variacions espectrals de l'antena així com el CRH de diferents espècies verdes i marrons dels bacteris verds del sofre (*Chlorobium limicola*, *C. vibrioforme*, *C. tepidum*, *C. phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides*) incubades a intensitats de llum per sota de l'òptim fisiològic. L'adaptació a aquestes condicions lumíniques va tenir lloc mitjançant dos mecanismes: un, quantitatiu, basat en l'increment del contingut específic de pigments antena (BCL y carotenoides) i un segon, qualitatiu, mitjançant el qual l'antena bacteriana es va enriquir en aquells homòlegs principals més alquilats. Aquest rearranjament del CRH es va donar a intensitats de llum de 0,1 i 0,5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, essent indispensable el creixement cel·lular perquè es portés a terme. L'enriquiment de l'antena en homòlegs més alquilats va causar, en les espècies investigades, un desplaçament del màxim d'absorció *in vivo* del cultiu cap a longituds d'ona menys energètiques, sense que això es traduís en un benefici net en l'absorció lumínica. Malgrat això, l'augment del grau d'alquilació de les BCLs antena sí pot contribuir a la canalització de l'energia d'excitació des d'aquestes molècules fins als centres de reacció presents a la membrana, optimitzant-se d'aquesta manera el rendiment del complex antena.

Per tal de constatar les hipòtesis postulades a partir dels experiments fisiològics, la segona fase de la investigació es va centrar en l'estudi de les variacions dels pigments antena en poblacions naturals de bacteris fotosintètics verds en diversos llacs estratificats. Totes les poblacions investigades van mostrar un patró d'homòlegs enriquit en aquells homòlegs més alquilats, molt diferent al mostrat per les mateixes espècies en condicions òptimes al laboratori. A més, tant les poblacions d'espècies verdes (*Pelodictyon clathratiforme*, "Chlorochromatium aggregatum", *Chloronema* spp.) com les d'espècies marrons (*Chlorobium phaeobacteroides*, *C. phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme*, "Pelochromatium roseum") van mostrar variacions en el CRH, tant amb la fondària com temporalment. Les variacions en fondària s'han atribuït a la segregació vertical de les cèl·lules d'acord amb el seu estat fisiològic. Les variacions temporals van tenir el seu origen en els canvis en el règim lumínic que es van produir durant el creixement estacional de la població, la qual va adaptar progressivament el contingut d'homòlegs fins assolir l'òptim sota les condicions de llum predominats.

La diversitat de patrons d'homòlegs en poblacions naturals de bacteris verds respon a dos tipus d'estratègies fotoadaptatives. Les espècies verdes, menys susceptibles de canviar el CRH, semblen basar la seva estratègia en la possessió d'un tipus o altra de BCl (BCl *c* o BCl *d*). Les espècies marrons, en canvi, basen el procés de fotoadaptació tant en un augment del contingut de carotenoides (isorenieratè) com en la capacitat de modular el CRH, enriquant l'antena en homòlegs alquilats de la BCl *e*. El primer mecanisme resulta clau per l'absorció selectiva de la llum i el segon, per a transferir, de forma eficient, l'energia absorbida als centres de reacció. Ambdós mecanismes optimitzarien el rendiment de l'antena fotosintètica sota condicions limitants de llum.

L'estudi dels patrons pigmentaris de les comunitats bacterianes fotosintètiques amb HPLC no només fa possible l'anàlisi precís dels diferents pigments sinó que, a la vegada, subministra informació valuosa des del punt de vista ecològic. Les investigacions portades a terme proporcionen algunes claus per comprendre les raons de la major adaptació de determinades espècies dels bacteris fotosintètics verds a les baixes intensitats de llum predominats en els seus hàbitats, alhora que profunditzen en el coneixement de les bases eco-fisiològiques d'aquesta adaptació.

RESUMEN

Las bacterias verdes poseen uno de los sistemas antena más complejos dentro del grupo de los microorganismos fotosintéticos. Una de las razones de dicha complejidad es la elevada diversidad en pigmentos antena, especialmente por lo que se refiere a las bacterioclorofilas (BCLs *c*, *d* o *e*). Cada una de estas BCLs, con distintas estructuras y propiedades ópticas, se compone de una mezcla de diversas formas homólogas dispuestas ordenadamente en el interior de las unidades antena (clorosomas). Esta diversidad pigmentaria dificulta enormemente el análisis y identificación de estos pigmentos mediante las técnicas espectrofotométricas tradicionales.

Para solucionar este problema se diseñó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permitió separar las distintas BCLs y sus correspondientes homólogos. El análisis cromatográfico reveló dos grupos de homólogos: un primer grupo ($T_r = 23-31$ min) formado por cuatro homólogos esterificados con farnesol, y un segundo ($T_r = 34-40$ min), cuantitativamente menos importante y en el que se agruparon diversos homólogos secundarios, el número de los cuales varía en función de la especie analizada y de su estado fisiológico. Además, el método desarrollado permite la separación de una gran diversidad de pigmentos fotosintéticos, tanto bacterianos (BCL *a*, BCL *g*, clorobacteno, isorenierateno, okenona) como algales (Cl *a*, α y β -caroteno, etc).

El análisis cromatográfico de extractos pigmentarios de diversas cepas de laboratorio de bacterias verdes del azufre reveló que el contenido relativo de los cuatro homólogos principales (CRH) es extremadamente variable. El hecho que dicha variabilidad estuviera más relacionada con aspectos fisiológicos del cultivo que con su taxonomía, junto con la disparidad de estos patrones pigmentarios con los obtenidos en muestras naturales, llevó a investigar el papel de los diferentes homólogos de las BCLs en la adaptación de las bacterias verdes del azufre a las bajas intensidades de luz. Con este objetivo, se analizaron las variaciones espectrales de la antena fotosintética así como el CRH de diferentes especies verdes y marrones de las bacterias verdes del azufre (*Chlorobium limicola*, *C. vibrioforme*, *C. tepidum*, *C. phaeobacteroides* y *C. phaeovibrioides*) incubadas a intensidades de luz por debajo del óptimo fisiológico. La adaptación a estas condiciones lumínicas tuvo lugar mediante dos mecanismos: uno, cuantitativo, basado en el incremento del contenido específico de pigmentos antena (BCL y carotenoides) y otro, cualitativo, mediante el cual la antena bacteriana se enriqueció en aquellos homólogos principales más alquilados. Este reajuste del CRH tuvo lugar a intensidades de luz de 0,1 y 0,5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, siendo necesario el crecimiento celular para que se llevase a cabo. El enriquecimiento de la antena en homólogos más alquilados causó, en las especies investigadas, un desplazamiento del máximo de absorción *in vivo* del cultivo hacia longitudes de onda menos energéticas, sin que esto se tradujese en un beneficio directo en la absorción lumínica. Sin embargo, el aumento del grado de alquilación de las BCLs antena sí puede contribuir a la canalización de la energía de excitación desde estas moléculas

hasta los centros de reacción localizados en la membrana, optimizándose de esta forma el rendimiento del complejo antena.

Con el fin de constatar las hipótesis postuladas a partir de los experimentos fisiológicos, la segunda fase de la investigación se centró en el estudio de las variaciones de los pigmentos antena en poblaciones naturales de bacterias fotosintéticas verdes de diversos lagos estratificados. Todas las poblaciones investigadas mostraron un patrón de homólogos enriquecido en aquellos homólogos más alquilados, muy diferente al mostrado por las mismas especies en condiciones óptimas en el laboratorio. Además, tanto las poblaciones de especies verdes (*Pelodictyon clathratiforme*, "Chlorochromatium aggregatum", *Chloronema* spp.) como las de especies marrones (*Chlorobium phaeobacteroides*, *C. phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme*, "Pelochromatium roseum") mostraron variaciones en el CRH, tanto con la profundidad como temporalmente. Las variaciones en profundidad se atribuyeron a la segregación vertical de las células de acuerdo a su estado fisiológico. Las variaciones temporales tuvieron su origen en los cambios en el régimen lumínico que se produjeron durante el crecimiento estacional de la población, la cual adaptó progresivamente el contenido de homólogos hasta alcanzar aquél que resultó óptimo bajo las condiciones de luz predominantes.

La diversidad de patrones de homólogos en poblaciones naturales de bacterias verdes responde a dos tipos de estrategias fotoadaptativas. Las especies verdes, menos susceptibles de cambiar el CRH, parecen basar su estrategia en la posesión de un tipo u otro de BCl (BCl *c* o BCl *d*). Las especies marrones, por su parte, basan el proceso de fotoadaptación tanto en un aumento del contenido de carotenoides (isorenierateno) como en la capacidad de modular el CRH, enriqueciendo la antena en homólogos alquilados de la BCl *e*. El primer mecanismo resulta clave para la absorción selectiva de la luz y el segundo, para transferir, de forma eficiente, la energía absorbida a los centros de reacción. Ambos mecanismos optimizarían el rendimiento de la antena fotosintética bajo condiciones lumínicas limitantes.

El estudio de los patrones pigmentarios de las comunidades bacterianas fotosintéticas con HPLC no sólo hace posible el análisis preciso de los diferentes pigmentos sino que a la vez suministra información valiosa desde el punto de vista ecológico. Las investigaciones llevadas a cabo proporcionan algunas claves para comprender las razones de la mejor adaptación de determinadas especies de bacterias verdes del azufre a las bajas intensidades de luz reinantes en sus hábitats, al mismo tiempo que profundizan en el conocimiento de las bases eco-fisiológicas de dicha adaptación.

SUMMARY

Green bacteria possess one of the most complex antenna systems within the group of the photosynthetic microorganisms. One of the reasons that account for this complexity is the high diversity of antenna pigments, the bacteriochlorophylls (BChls *c*, *d* or *e*), that are mixtures of several homologous forms regularly arranged within the antenna units (the chlorosomes). This pigment diversity difficults the accurate analysis and identification of the different bacteriochlorophylls forms by the conventional spectrophotometrical techniques.

In order to resolve this problem, a new high performance liquid chromatography (HPLC) reversed-phase method that allows to separate the different BChls and their correspondant homologs has been designed. The chromatographic analysis of pigment extracts revealed two groups of homologs: a first group, eluted between 23-31 minutes, composed by four main farnesil-homologs and a second one, eluted between 34-40 min, quantitatively less important that is formed by several homologs. The number of these secondary homologs is quite variable depending on both, the species involved and its physiological status. The method also provides a good separation of other photosynthetic pigments, either bacterial (BChl *a*, BChl *g*, chlorobactene, isorenieratene, okenone, etc) or algal ones (Chl *a*, α and β -carotene, etc).

A preliminary screening of the homolog composition of several green sulfur bacterial laboratory strains, has revealed different relative content of the four main homologs (CRH). The fact that these variations seem to be related to physiological aspects rather than a to taxonomical ones, together with the differences of these pigment patterns with those obtained from natural populations, induced us to investigate the role of the different BChl homologs on the adaptation of green sulfur bacteria to low light intensities. For this purpose, the spectral variations in the photosynthetic antenna as well as the CRH were measured in different green and brown species of green sulfur bacteria (*Chlorobium limicola*, *C. vibrioforme*, *C. tepidum*, *C. phaeobacteroides* and *C. phaeovibrioides*) incubated at light intensities below their physiological optimum. The adaptation to these light conditions was produced by two mechanisms: a quantitative one, that is, an increase in the specific content of antenna pigments (BChl and carotenoids), and a qualitative one, that consists of the enrichment of the photosynthetic antenna in highly alkylated homologs. This re-arrangement of BChl homologs needs cell multiplication and is only apparent at sub-optimal and critical light intensities ($< 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The enrichment of the antenna in more alkylated homologs caused, in the studied species, a shift of the *in vivo* absorption maximum of the culture towards less energetic, red-wavelengths, but did not produce any benefit in the absorption range. However, it seems plausible that it plays an important role on the funneling of excitation among the BChl molecules towards the reaction centers located in the membrane. This can be interpreted as a mechanism to optimize the efficiency of the photosynthetic unit under low light intensities.

The second aim of the work was to corroborate the physiological hypothesis by studying the variations of antenna pigments in natural populations of green photosynthetic bacteria grown in several stratified lakes. All the populations studied showed an homolog patterns enriched in highly alkylated homologs, clearly different from those obtained for the same species grown under optimal conditions in the laboratory. Furthermore, natural populations of both green species (*Pelodictyon clathratiforme*, "Chlorochromatium aggregatum", *Chloronema* spp.) and brown ones (*Chlorobium phaeobacteroides*, *C. phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme*, "Pelochromatium roseum") exhibited spatial and temporal changes in their CRH. Vertical changes are attributable to the self-stratification of the population, according to the physiological status of the cells. Temporal variations in the CRH was related to gradual changes in light regime during growth. The adaptation of the population ceased when the suitable homologs content for the prevalent light conditions was achieved.

The diversity of BChl homolog patterns in natural populations of green photosynthetic bacteria results from two different photoadaptive strategies. The strategy of green species is based on the presence of BChl *c* or *d*. BChl *d*-containing species seems to be more adapted to low light climates than BChl *c*-containing ones. In turn, the photoadaptation of brown species involve both the increase in isorenieratene content and the enrichment of the antenna in BChl *e*₃ and BChl *e*₄. The first mechanism is useful for the selective absorption of light whereas the second may considerably improve the energy transfer to reaction centers, improving the yield of the photosynthetic antenna under light limitation.

The study of pigment patterns from natural photosynthetic bacterial communities by HPLC not only allows an accurate pigment analysis, but also provides valuable eco-physiological information. This study provides some clues for understanding the eco-physiological basis of the excellent adaptation of some species of green photosynthetic bacteria to low light intensities in both, laboratory conditions and their natural environments.

Contingut

1. Introducció

1.1. Introducció	3
1.2. Els bacteris verds del sofre.....	7
1.2.1. Estructura i organització de l'aparell fotosintètic	8
1.2.1.1. Clorosomes	8
1.2.1.2. Proteïnes FMO, membrana plasmàtica i centres de reacció	14
1.2.1.3. Transferència d'energia	15
1.3. Objectius i estructura del treball	16
1.3.1. Objectius i pla de treball	16
1.3.2. Estructura del treball.....	17

2. Material i Mètodes

2.1. Equipament i reactius	21
2.1.1. Equipament.....	21
2.2.2. Reactius	21
2.2. Material biològic i mètodes d'aïllament i cultiu	21
2.2.1. Microorganismes.....	21
2.2.2. Purificació i aïllament de bacteris fotosintètics del sofre	22
2.2.2.1. Enriquiment	23
2.2.2.2. Aïllament i identificació	23
2.2.2.3. Cultiu de bacteris fotosintètics del sofre	23
2.3. Mètodes analítics de pigments fotosintètics.....	25
2.3.1. Anàlisi espectrofotomètrica	25
2.3.1.1. Anàlisi qualitativa	25
2.3.1.2. Anàlisi quantitativa.....	27
2.3.2. Anàlisi per Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC).....	30
2.3.2.1. Instrumental i particularitats analítiques	30
2.3.2.2. Tractament de les mostres	32
2.3.2.3. Anàlisi qualitativa	33
2.3.2.4. Anàlisi quantitativa	33
2.4. Mètodes analítics específics	35
2.4.1. Determinació de la concentració de proteïnes	35
2.4.2. Aïllament de fraccions sub-cel·lulars fotosintètiques	35
2.4.3. Fluorimetria.....	37

2.5. Mètodes de camp	38
2.5.1. Zones d'estudi	38
2.5.1.1. Estany de Banyoles	38
2.5.1.2. Estanyol Coromina	40
2.5.1.4. Altres	41
2.5.2. Mostratge	42
2.5.3. Paràmetres físics	44
2.5.3.1. Temperatura i conductivitat	44
2.5.3.2. Penetració de la llum	44
2.5.4. Paràmetres químics	45
2.5.4.1. pH i potencial d'òxido-reducció	45
2.5.4.2. Oxigen dissolt	45
2.5.4.3. Sulfhídric	45

3. Aplicació de la tècnica de HPLC en l'anàlisi de pigments fotosintètics bacterians

3.1. Introducció	49
3.2. Resultats	51
3.2.1. Separació i identificació dels pigments fotosintètics	51
3.2.1.1. Bacteris verds del sofre	52
3.2.1.2. Bacteris verds filamentosos	55
3.2.1.3. Cromatiàcies	55
3.2.1.4. Heliobacteris	58
3.2.3. Composició d'homòlegs en diferents espècies de bacteris verds del sofre	61
3.3. Discussió	61

4. Fisiologia de l'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum

4.1. Introducció	69
4.2. Resultats	70
4.2.1. Adaptació dels pigments antena dels bacteris verds del sofre a les intensitats baixes de llum	70
4.2.1.1. Condicions experimentals	70
4.2.1.2. Creixement	72
4.2.1.3. Composició pigmentària	74
4.2.1.4. Anàlisi cromatogràfica	75

4.2.2. Variacions dels pigments antena durant el creixement	
de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	79
4.2.2.1. Condicions experimentals.....	79
4.2.2.2. Creixement.....	82
4.2.2.3. Composició pigmentària	82
4.2.2.4. Anàlisi cromatogràfica.....	84
4.2.3. Fotoadaptació de l'aparell fotosintètic de <i>Chlorobium tepidum</i>	87
4.2.3.1. Condicions experimentals.....	87
4.2.3.2. Creixement.....	88
4.2.3.3. Aïllament de fraccions sub-cel·lulars fotosintètiques	90
4.2.3.4. Composició pigmentària	90
4.2.3.5. Anàlisi fluorimètrica.....	94
4.2.3.6. Anàlisi cromatogràfica.....	95
4.3. Discussió.....	98
4.3.1. Fotoadaptació quantitativa: increment del contingut específic	
de pigments antena.....	99
4.3.2. Fotoadaptació qualitativa: canvis en la composició pigmentària	
i organització dels complexos antena.....	104
4.3.3. Interpretació fisiològica de les variacions en el contingut d'homòlegs	105
5. Heterogeneïtat dels pigments antena en poblacions naturals de bacteris verds	
5.1. Introducció	113
5.2. Resultats	115
5.2.1. Entorn físico-químic.....	115
5.2.1.1. Cubeta III.....	115
5.2.1.2. Cubeta IV	120
5.2.1.3. Estanyol Coromina	123
5.2.1.4. Altres	127
5.2.2. Identificació de les poblacions de bacteris fotosintètics	
predominants als ecosistemes estudiats	129
5.2.2.1. Cubetes III i IV	129
5.2.2.2. Estanyol Coromina	131
5.2.2.3. Altres	133
5.2.3. Dinàmica espacio-temporal del contingut de pigments antena	135
5.2.3.1. Cubeta III.....	135
5.2.3.2. Cubeta IV	141
5.2.3.3. Estanyol Coromina	145

5.2.4. Diversitat dels patrons d'homòlegs de les bacterioclороfil·les en poblacions naturals de bacteris verds	147
5.2.4.1. Poblacions naturals d'espècies marrons: Diversitat de patrons de BCl <i>e</i>	147
5.2.4.2. Poblacions naturals d'espècies verdes: Diversitat de patrons de BCl <i>c</i> i <i>d</i>	147
5.2.5. Ecologia pigmentària dels bacteris fotosintètics del sofre: variacions espacio-temporals del contingut d'homòlegs	149
5.2.5.1. Cubeta III	152
5.2.5.2. Cubeta IV	156
5.2.5.3. Estanyol Coromina	158
5.3. Discussió.....	160
5.3.1. Comparació entre la determinació espectrofotomètrica i cromatogràfica de Clorofil·la <i>a</i> i bacterioclороfil·les en mostres naturals	160
5.3.2. Significació ecològica de la variació qualitativa del contingut de pigments antena en poblacions naturals de bacteris verds	162
5.3.2.1. Espècies verdes	164
5.3.2.2. Espècies marrons	165
5.3.3. Els patrons pigmentaris com a indicadors eco-fisiològics	170
6. Discussió general	
6.1. Discussió general.....	180
7. Conclusions i propostes	
7.1. Conclusions	185
7.2. Propostes per a futures investigacions	186
7.3. <i>Concluding remarks</i>	187
7.4. <i>Suggestions for further work</i>	189
8. Bibliografia	193

1. INTRODUCCIÓ



1.1. INTRODUCCIÓ

Els bacteris fotosintètics inclouen dos grans grups: els cianobacteris i els bacteris fotosintètics anoxigènics. Les diferències entre ambdós tenen a veure tant amb el tipus de pigment que contenen i l'estructura del seu aparell fotosintètic com amb les seves característiques fisiològiques i ecològiques (Stanier *et al.*, 1981). El procés fotosintètic en ambdós grups es basa, igual que en la resta d'organismes fotosintètics, en l'absorció de la llum per diferents pigments (antena) i el posterior transport d'aquesta energia als centres de reacció, on és convertida en l'energia química necessària pel metabolisme cel·lular.

Els cianobacteris realitzen una fotosíntesi oxigènica amb un fotosistema similar estructuralment al de les plantes superiors. Una característica d'aquest grup és la presència de ficobilisomes, uns complexos antena extramembranosos constituïts per subunitats proteïques associades amb pigments del tipus de les ficocianines i ficoeritrines (Gantt, 1986).

Els bacteris fotosintètics anoxigènics, en canvi, requereixen de condicions anaeròbiques, ja que la síntesi de pigments és inhibida per l'oxigen. Una excepció són els bacteris anoxigènics aerobis com ara *Erythrobacter longus*, els quals contenen bacterioclороfil·la però són incapaços de créixer en condicions anaeròbiques (Shimada, 1995). En la fotosíntesi anoxigènica, l'absència del fotosistema II fa que el poder reductor s'obtingui d'una sèrie de substrats exògens de potencial redox més electronegatiu que l'aigua. D'entre aquests, destaquen el sulfhídric (H_2S) i altres compostos reduïts del sofre (S^0 , $S_2O_3^{2-}$), l'hidrogen i algunes molècules orgàniques senzilles. La distribució dels bacteris anoxigènics sol anar lligada a sediments anaeròbics i zones anòxiques d'ecosistemes aquàtics amb sulfhídric i suficientment il·luminades.

El grup dels bacteris fotosintètics anoxigènics és extremadament heterogeni atès les seves característiques estructurals, fisiològiques i moleculars. Aquest grup es divideix en tres subgrups: els bacteris vermells, els bacteris verds i els heliobacteris (Imhoff, 1995). La utilització del 16S rRNA com a criteri classificador ha permès adscriure els bacteris fotosintètics en grups filogenètics superiors: els grup dels cianobacteris, el dels bacteris verds del sofre, el grup de *Chloroflexus* i relacionats, i el grup dels bacteris vermells i relacionats (Woese *et al.*, 1985). Aquests darrers s'inclourien dins del grup dels Proteobacteris mentre que els heliobacteris estarien situats dintre del grup dels Eubacteris grampositius (Woese *et al.*, 1985; Woese, 1987; Beer-Romero *et al.*, 1988).

Els bacteris vermells es divideixen en bacteris vermells del sofre, que comprenen dues famílies incloses dins del grup γ -Proteobacteria –les Chromatiaceae i les Ectothiorhodospiraceae–, i els bacteris vermells no del sofre, inclosos dins dels grups α i β -Proteobacteria i que comprenen una sola família –les Rhodospirillaceae– (Woese, 1987; Imhoff, 1995). L'aparell fotosintètic dels bacteris vermells es troba localitzat en membranes intracitoplasmàtiques disposades en forma de vesícules,

túbuls o lamel·les. Els pigments fotosintètics són BCl *a* (en algunes espècies també BCl *b*) i carotenoides de la sèrie de l'okenona, espiril·loxantina i el rodopinal (Schmidt, 1978). El sofre resultant de l'oxidació del sulfhídric es deposita en el interior de les cèl·lules en forma de glòbuls (Chromatiaceae) o bé en el seu exterior (Ectothiorhodospiraceae).

Els bacteris verds comprenen dos grans grups no relacionats filogenèticament, els bacteris verds del sofre (referits sovint com a Chlorobiaceae) i els bacteris filamentosos multicel·lulars (Chloroflexaceae). Els bacteris verds del sofre constitueixen un tàxon filogenèticament compacte dins la branca dels Eubacteris, mentre que les Chloroflexaceae es troben dins un tàxon (bacteris verds no del sofre i relacionats) més heterogeni (Gibson *et al.*, 1985; Woese, 1987). Apart d'aquestes divergències, ambdós grups es diferencien clarament en base a trets fenotípics com ara la forma i mida de les cèl·lules, la composició pigmentària i la capacitat d'utilitzar diferents substractes orgànics (Trüper i Pfennig, 1981; 1992; Pierson i Castenholz, 1992a, b). Aquests criteris fenotípics són els que s'han utilitzat tradicionalment en la diferenciació taxonòmica dels bacteris fotosintètics verds en les famílies Clorobiàcies i Cloroflexàcies, tot i que actualment aquesta classificació està caiguent en desús ja que no té el mateix valor que d'altres basades en criteris filogenètics, com ara les famílies del grup dels bacteris vermells (Trüper i Pfennig, 1981; Fowler *et al.*, 1984; Stackerbrandt *et al.*, 1984; Imhoff i Trüper, 1989).

El descobriment de dos nous bacteris fotosintètics anoxigènics –*Heliobacterium chlorum* (Gest i Favinger, 1983) i *Heliobacillus mobilis* (Beer-Romero i Gest, 1987)– que no encaixaven en els grups citats anteriorment va portar a descriure el grup dels heliobacteris. Els heliobacteris són microorganismes típics del sòl, relacionats filogenèticament amb la línia dels bacteris grampositius (Woese *et al.*, 1985; Beer-Romero *et al.*, 1988). Les característiques del seu aparell fotosintètic són completament diferents a les de la resta de bacteris fotosintètics anoxigènics. Com a pigments antena posseeixen un nou tipus de bacterioclorofil·la, la BCl *g*, i neurosporè (Brockmann i Lippinski, 1983), i no presenten ni els clorosomes característics dels bacteris verds del sofre o *Chloroflexus* ni les membranes intracitoplasmàtiques presents en els bacteris vermells. A més, fixen nitrogen i algunes espècies poden diferenciar endospores (Ormerod *et al.*, 1990).

Els diferents grups de bacteris fotosintètics anaeròbics també difereixen en el metabolisme del carboni. Com la majoria dels organismes fotosintètics, els bacteris vermells fixen el CO₂ a partir del cicle de les pentoses fosfat (Calvin, 1951) utilitzant el H₂S com a donador d'electrons per la reducció del CO₂. Els bacteris verds del sofre en canvi, fixen el CO₂ mitjançant el cicle reductiu dels àcids tricarboxílics – o cicle d'Arnon – (revisions a Ormerod i Sirevåg, 1983 i Sirevåg, 1995). Ambdós mecanismes de fixació són absents en les Cloroflexàcies que utilitzen el cicle del 3-hidroxiopropionat (Holo i Sirevåg, 1986; Holo, 1989). Els heliobacteris, per la seva banda, no creixen autotròficament degut a l'absència de la majoria d'enzims implicats en el cicles de Calvin o d'Arnon (Pickett *et al.*, 1994). En aquest cas, el creixement

es dona autoheterotròficament a partir de molècules orgàniques senzilles, com ara l'acetat, el piruvat o el lactat (Madigan i Ormerod, 1995). El creixement fotoheterotròfic també és present en la resta de bacteris fotosintètics anoxigènics, tot i que la diversitat dels substrats utilitzables depèn de l'espècie en qüestió.

Des del punt de vista pigmentari, els bacteris fotosintètics anoxigènics posseeixen diferents tipus de bacterioclorofil·les (BCl) amb característiques estructurals i funcionals diverses (Taula 1.1). Pel que fa la seva estructura, les BCl són anells porfirínics constituïts per una estructura planar de quatre anells pirròlics coordinats amb un àtom central de magnesi (Figura 1.1). Aquest àtom afavoreix la creació en la molècula d'estats d'excitació més elevats i resulta per tant molt més funcional que l'àtom de ferro present en d'altres pigments relacionats (Lawlor, 1990). Altres característiques de les bacterioclorofil·les són la presència d'un anell isocíclic de pentanona (anell V) i d'un alcohol esterificat en el grup propiònic del carboni 17. Aquest alcohol varia en funció del tipus de BCl, tot i que en la majoria dels casos és el farnesol (BCl *c*, *d* i *e*), i el fitol o el geranil-geraniol (BCl *a*, *b*) (Gloe i Pfennig, 1974; Senge i Smith, 1995).

Les dimensions de la molècula i l'elevat nombre de dobles enllaços faciliten la captura de fotons i la transferència de l'excitació mitjançant la deslocalització dels electrons en els orbitals π . La presència d'aquest sistema d'orbitals dona com a resultat espectres d'absorció complexes que mostren les transicions electròniques de la molècula (Döring *et al.*, 1969; Clayton, 1980). En estudiar el comportament espectroscòpic utilitzant llum polaritzada es poden distingir en la molècula dos eixos de transició: un eix *x*, que passa a través dels àtoms de nitrogen dels anells II i IV, i un eix *y*, que ho fa a través dels corresponents N dels anells I i III (Figura 1.2A). Les bandes d'absorció a la zona blava i vermella de l'espectre s'anomenen B (Soret) i Q, respectivament i, dins de cadascuna d'elles, es poden diferenciar les polaritzacions atribuïdes als eixos *x* i *y* esmentats (Figura 1.2 B). Aquestes característiques espectrals són extremadament útils en la pràctica, ja que cada tipus de BCl pot ser identificada pel seus màxims d'absorció, tant *in vivo* com en solvents orgànics (veure Capítol 2).

Amb l'absorció d'un fotó de llum per una molècula antena s'inicien un seguit de processos amb els quals aquesta energia d'excitació es transfereix, primer entre les diferents molècules antena i després des d'aquestes fins el(s) centre(s) de reacció (CR). La transferència d'energia entre l'antena i el CR dura uns pocs picosegons. Aquests processos són les anomenades *reaccions físiques* de la fotosíntesi. Les *reaccions químiques* tenen lloc als centres de reacció, on l'energia d'excitació rebuda és convertida en energia química. Aquests processos es realitza mitjançant la transferència de càrregues des d'unes molècules especials de pigment a una cadena d'acceptors-donadors d'electrons i l'acoplament d'aquesta transferència a la síntesi d'ATP (fotofosforil·lació).

Taula 1.1. Principals característiques de les bacteriolorofil·les (segons Scheer, 1991; Imhoff, 1995; Senge & Smith, 1995).

Table 1.1. Main characteristics of the bacterial chlorophylls (from Scheer, 1991; Imhoff, 1995; Senge & Smith, 1995).

Tipus	Pes molecular	Alcohol ^a esterificat	Pes molecular	Funció ^b	Presència ^c
Bacteriolorofil·la <i>a</i> (C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₆ Mg)	910	F (C ₂₀ H ₄₀ O)	296	A + CR	BVrm, BVrd
	904	Gg (C ₂₀ H ₃₄ O)	290		
Bacteriolorofil·la <i>b</i> (C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg)	908	F, Gg, FE	296	A + CR	BVrm ^d
Bacteriolorofil·la <i>c</i> ^e	814 ^f	F	222	A	BVrd ^g
		S (C ₁₈ H ₃₈ O), altres ^g	270		
Bacteriolorofil·la <i>d</i> ^e	806 ^f	F	222	A	BVrd ^g
			altres ^g		
Bacteriolorofil·la <i>e</i> ^e	828 ^f	F	222	A	BVrd ^g
			altres ^g		
Bacteriolorofil·la <i>g</i> (C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg)	886	F, Gg	222,290	A + CR	Heliobacteris

^a F: Farnesol; Gg: Geranil-geraniol; FE: Fitodienol; S: Estearol

^b A: Antena; CR: Centre de Reacció

^c BVrm: Bacteris vermells; BVrd: Bacteris verds

^d Només en algunes espècies de bacteris vermells (*Rhodospseudomonas viridis*, *R. sulfoviridis*, *Thiocapsa pfennigii*, *Ectothiorhodospira halochlororis* i *E. abdelmalekii*)

^e Estructura molt variable degut a la mescla d'homòlegs (veure Capítol 3)

^f Estimat com la mitja entre els pesos moleculars dels quatre homòlegs principals de cada BCl

^g Alcohols diversos trobats a *C. limicola* (Caple et al., 1978): tetrahidrogeranil-geraniol; cis-9-hexadecen-1-ol; 4 undecil 2-furanmetanol

^h Espècies verdes

ⁱ Espècies marrons

^a F: Farnesol; Gg: Geranyl-geraniol; FE: Fitodienol; S: Estearol

^b A: Antenna; CR: Reaction Center

^c BVrm: Purple bacteria; BVrd: Green bacteria

^d Only in some species of purple bacteria (*Rhodospseudomonas viridis*, *R. sulfoviridis*, *Thiocapsa pfennigii*, *Ectothiorhodospira halochlororis* and *E. abdelmalekii*)

^e High variable structure due to the different homolog mixture (see Capítol 3)

^f Mean molecular weights of the four main BCl homologs

^g Alcohols found in *C. limicola* (Caple et al., 1978): tetrahidrogeranyl-geraniol; cis-9-hexadecen-1-ol; 4 undecil 2-furanmethanol

^h Green species

ⁱ Brown species

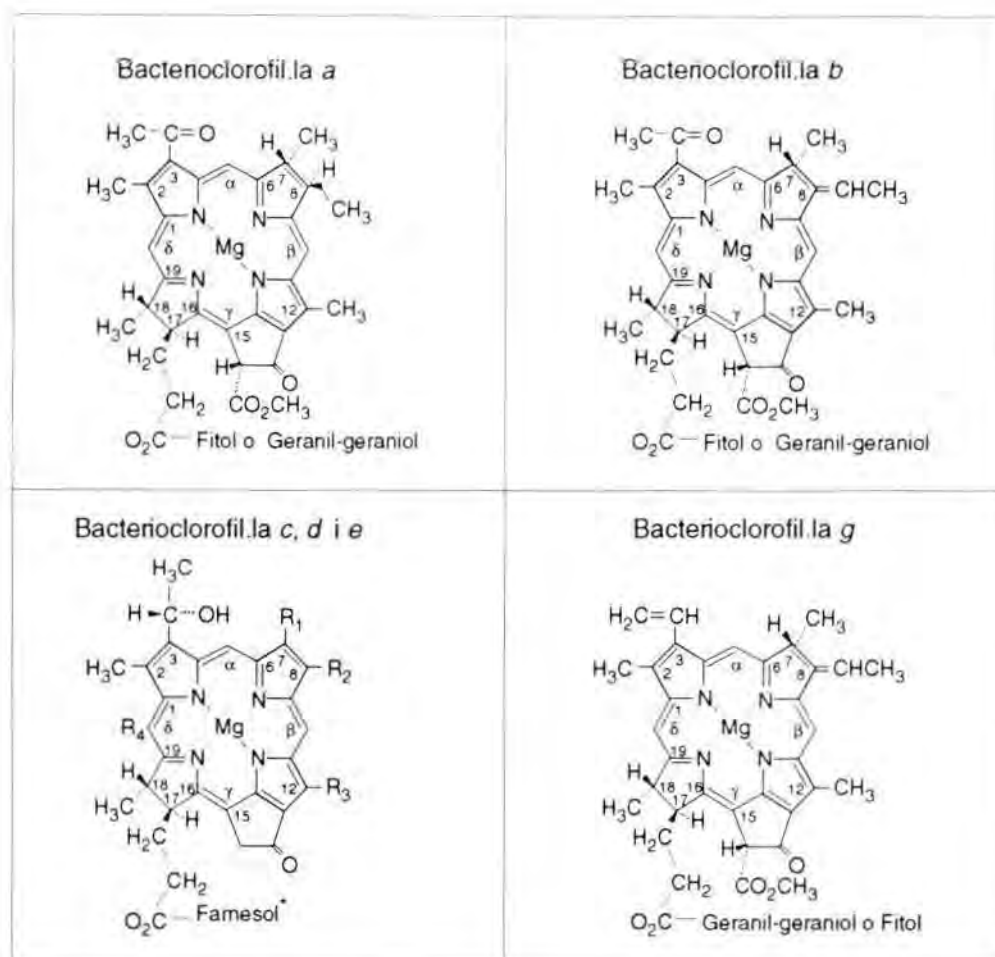


Figura 1.1. Principals tipus de bacterioclorofil·les. En les BChl c, d i e, els substituents R_1 , R_2 i R_3 tenen una elevada variabilitat (veure Capítol 3 per detalls). * El farnesol és el principal alcohol esterificat en els bacteris verds del sofre però poden trobar-se d'altres (Caple *et al.*, 1978). En bacteris verds filamentosos (*Chloroflexus*) la natura d'aquest alcohol esterificat en C-17 constitueix la principal font de variació entre els diferents homòlegs (Gloe & Risch, 1978; Larsen *et al.*, 1995).

Figure 1.1. Main types of bacteriochlorophylls. In BChl c, d and e, the R_1 , R_2 and R_3 substituents are highly variable (see Chapter 3). * Farnesol is the primary esterifying alcohol in green sulfur bacteria but other types of alcohols can also be found (Caple *et al.*, 1978). In filamentous green bacteria (*Chloroflexus*) different esterifying alcohols in C-17 are the main source of variation between BChl c homologs (Gloe & Risch, 1978; Larsen *et al.*, 1995).

1.2. ELS BACTERIS VERDS DEL SOFRE

Els bacteris verds del sofre inclouen una quinzena d'espècies que constitueixen un grup filogenètic propi (Stackerbrandt i Woese 1981; Gibson *et al.*, 1985; Woese, 1987) amb característiques fisiològiques similars (Taula 1.2) (Trüper i Pfennig, 1992). Tots els seus representants són anaeròbics estrictes i fotòtrofs obligats. Creixen autotròficament utilitzant el CO_2 com a font de carboni que és assimilat via el cicle reductiu dels àcids tricarboxílics (Evans *et al.*, 1966) i fotoheterotròficament utilitzant molècules orgàniques senzilles. El principal donador d'electrons és el sulfhídric, que és oxidat a sofre elemental i dipositat extracel·lularment en forma de glòbuls,

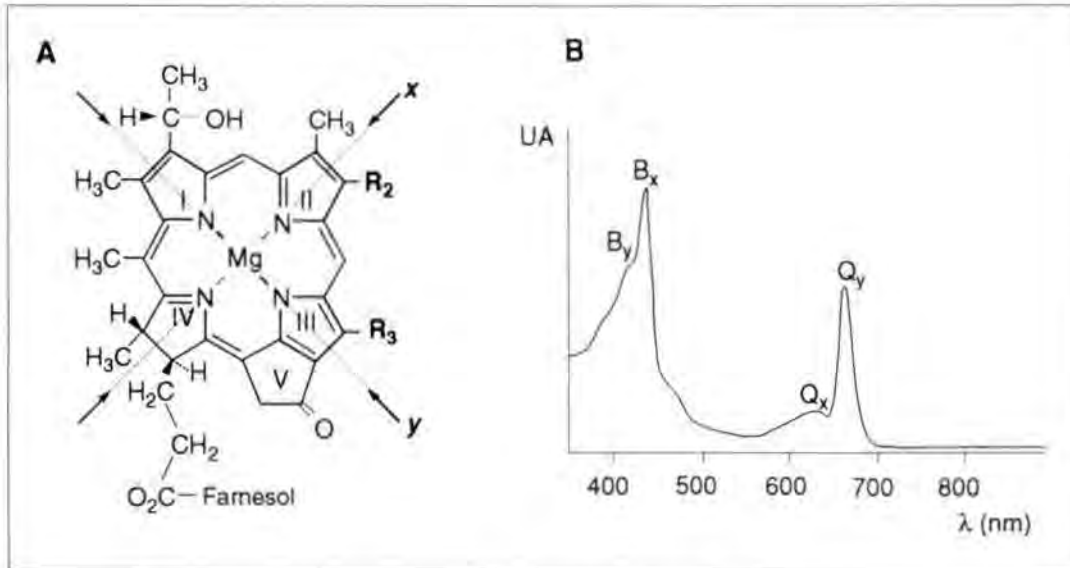


Figura 1.2. (A) Estructura química de la BCl *c* on es mostren els eixos de transició electrònica de la molècula (ratlles de punts). Els substituents a C-8 i C-12 (R_2 i R_3) varien en funció del tipus de bacterioclorigil·la i homòleg (veure Capítol 3). (B) Espectre d'absorció de la BCl *c* en extracte acetònic on es mostren les bandes d'absorció B i Q atribuïdes a cadascun dels eixos de transició (x i y).

Figure 1.2. (A) Chemical structure of BChl *c* showing the electronic transitions across the molecule (dotted lines). Substituents at C-8 and C-12 (R_2 and R_3) change depending on the bacteriochlorophyll type and homolog involved (see Chapter 3). (B) Absorption spectrum of BChl *c* in acetonic extract. The absorption bands associated with the x and y transitions are shown.

els quals, són finalment oxidats a sulfat. Algunes soques poden utilitzar també el tiosulfat i l'hidrogen molecular com a font d'electrons. La majoria d'espècies requereixen vitamina B₁₂ (cianocobalamina) pel creixement, ja que és indispensable pel desenvolupament de l'aparell fotosintètic i la síntesi de pigments (Pfennig i Lippert, 1966; Fuhrmann *et al.*, 1993).

1.2.1. Estructura i organització de l'aparell fotosintètic

Com la resta de microorganismes fototròfics, l'aparell fotosintètic dels bacteris verds del sofre es troba constituït per tres components bàsics: el complexe antena, els centres de reacció i la cadena de transport electrònic. Els primers es troben localitzats en orgànuls individualitzats, mentre que els dos darrers formen part inherent de la membrana citoplasmàtica.

1.2.1.1. Clorosomes

El complexe antena dels bacteris verds del sofre és únic dins dels sistemes captadors de llum dels bacteris fotosintètics. L'especialització de l'antena és tan elevada que requereix només una quarta part de la llum que necessiten els bacteris vermells del sofre per créixer a taxes comparables (Bielb i Pfennig, 1978). Aquest destacat rendiment de la captació d'energia s'aconsegueix gràcies a dos fets: i) l'elevat número de molècules de BCl que constitueixen l'antena; fins a 10.000 molècules de

Taula 1.2. Principals característiques dels bacteris verds del sofre (Modificat de Imhoff, 1992).

Table 1.2. Main characteristics of green sulfur bacteria (After Imhoff, 1992).

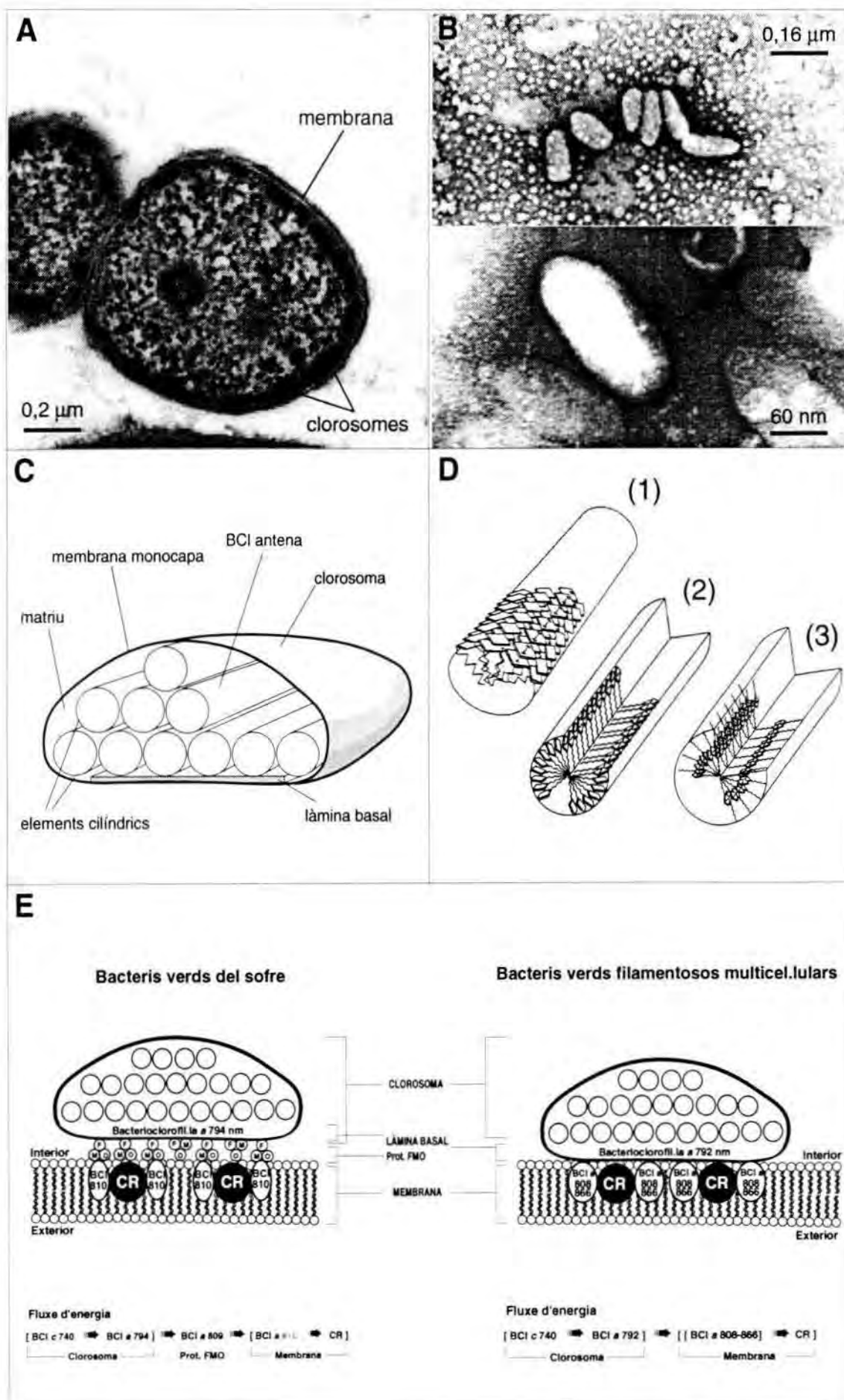
Espècie	Morfologia	Diàmetre cel. (µm)	Color	BCI	Car	Vacuòls de gas	Requer. NaCl	Donador d'e ⁻	G+C (% mol)	Hàbitat
<i>Chlorobium</i>										
<i>limicola</i>	bacil	0,7–1,0	verd	c-d	Cbt, Nrp	-	-	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃	51,0–58,1	Planctònic
<i>vibrioforme</i>	vibri	0,5–0,7	verd	c-d	Cbt	-	+	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃	52,0–57,1	Planctònic
<i>phaeobacteroides</i>	bacil	0,6–0,8	marró	e	Isr, β-Isr	-	-	H ₂ S, S ⁰	49,0–50,0	Planctònic
<i>phaeovibrioides</i>	vibri	0,3–0,4	marró	e	Isr, β-Isr	-	+	H ₂ S, S ⁰	52,0–53,0	Planctònic
<i>chlorovibrioides</i>	vibri	0,3–0,4	verd	c-d	Cbt	-	+	H ₂ S, S ⁰	-	Planctònic
<i>tepidum</i>	bacil	0,6–0,8	verd	c	Cbt	-	-	S ₂ O ₃	56,5–58,2	Bentònic
<i>Pelodictyon</i>										
<i>luteolum</i>	ovoide	0,6–0,9	verd	c	Cbt	+	-	H ₂ S, S ⁰	53,5–58,1	Planctònic
<i>clathratiforme</i>	bacil	0,7–1,2	verd	d	Cbt	+	-	H ₂ S, S ⁰	48,5	Planctònic
<i>phaeum</i>	vibrio	0,6–0,9	marró	e	Isr, β-Isr	+	+	H ₂ S, S ⁰	-	Planctònic
<i>phaeoclathratiforme</i>	bacil	0,6–0,9	marró	e	Isr, β-Isr	+	-	H ₂ S, S ⁰	-	Planctònic
<i>Prostecochloris</i>										
<i>aestuarii</i>	coc	0,5–0,7	verd	c	Cbt	-	+	H ₂ S, S ⁰	50,0–56,0	Planctònic
<i>phaeoasteroidea</i>	coc	0,4–0,6	marró	e	Isr, β-Isr	-	+	H ₂ S, S ⁰	52,2	Planctònic
<i>Ancalochloris</i>										
<i>perfilievii</i>	coc	0,5–1,0	verd	c?	Cbt?	+	-	H ₂ S, S ⁰	-	Planctònic
<i>Chloroherpeton</i>										
<i>talassium</i>	bacil	1	verd	c	γ-carotè	+	+	H ₂ S, S ⁰	45,0–48,2	Bentònic

BCl *c*, *d* o *e* i unes 400 de BCl *a* per cada clorosoma i unes 1500 molècules de BCl per CR (Olson, 1980a; Golecki i Oelze, 1987; Blankenship et al. 1988) i ii) l'elevat nivell d'organització i arranjamet d'aquestes molècules, que possibilita una elevada taxa de transferència d'energia vers els CR. Ambdues característiques fan que l'antena es converteixi en una "unitat fotosintètica" extremadament funcional, capaç de possibilitar el creixement a intensitats de llum extremadament baixes. Overmann i col.laboradors (1992) han descrit poblacions actives de Clorobiàcies marrons creixent a 80 m de fondària al Mar Negre on la llum disponible és del 0,0005 % de la incident a la superfície.

El complexe antena es troba confinat en els clorosomes, que són presents tant en els bacteris verds del sofre com en els bacteris filamentosos multicel.lulars (Cloroflexàcies). El fet que dos grups tan allunyats filogenèticament comparteixin un mateix tipus de complexe antena ha portat a pensar en processos de transferència gènica (Pierson i Olson, 1989). Els clorosomes –antigament coneguts com vesícules de *Chlorobium*– són cossos allargats, en forma de bossa de tamany variable i adherits a la cara interna de la membrana citoplasmàtica (Figura 1.3.A, B). Aquestes vesícules estan limitades per una membrana monocapa de naturalesa lipídica constituïda bàsicament per glicolípid, com ara el monogalactòsid diglicèrid (Cohen-Bazire et al., 1964; Cruden i Stanier, 1970; Cruden et al., 1970; Stahelin et al., 1978, 1980; Betti et al., 1982; Feick i Fuller, 1984; Holo et al., 1985; Sprague i Varga, 1986). L'interior del clorosoma, de naturalesa hidrofòbica, es troba densament empaquetat, amb un nombre variable d'estructures cilíndriques d'uns 10 nm de diàmetre que resulten de l'agregació de les diferents molècules de BCl (Figura 1.3.C) (Stahelin et al., 1978, 1980; Betti et al., 1982; Blankenship et al., 1988; Sprague i Fuller, 1991; Blankenship et al., 1995). Aquestes estructures oligomèriques, que es donen

Figura 1.3. Pàgina següent. (A) Micrografia al TEM d'un tall d'una cèl.lula de *Chlorobium phaeobacteroides* on es mostren els clorosomes, localitzats immediatament per sota la cara interna de la membrana plasmàtica. (B) Micrografies al SEM de clorosomes aïllats de *Chlorobium phaeobacteroides* on es pot apreciar la morfologia el.lipsoidal característica d'aquestes vesícules. (C). Esquema de la estructura interna dels clorosomes on es mostra la distribució dels elements cilíndrics constituïts per molècules de BCl i la localització de la làmina basal de BCl *a* (modificat de Olson, 1980a). (D) Diferents models proposats per explicar la ordenació i orientació de les molècules de BCl en els elements cilíndrics, segons: (1) Matsuura et al. (1993); (2) Nozawa et al. (1993) i (3) Nozawa et al. (1994). (E) Comparació entre l'estructura de l'aparell fotosintètic dels bacteris verds del sofre i la dels bacteris verds filamentosos. Es mostra també el camí que segueix el fluxe d'excitació des de les molècules antena fins als centres de reacció en ambdós grups de bacteris.

Figure 1.3. Next page. (A) TEM micrograph of a thin section of a *Chlorobium phaeobacteroides* cell where the location of chlorosomes is shown. (B) SEM micrographs of chlorosomes isolated from *Chlorobium phaeobacteroides* where the ellipsoidal morphology of these vesicles is clearly visible. (C). Schematic view of the internal structure of chlorosomes (modified from Olson, 1980a). (D) Different proposed models for organization of BCl molecules in the rod elements of chlorosomes, according to: (1) Matsuura et al. (1993); (2) Nozawa et al. (1993) and (3) Nozawa et al. (1994). (E) Comparison between the photosynthetic apparatus of green sulfur bacteria and that of green filamentous bacteria. The different paths of energy flow in both groups are also shown.



sense la participació de proteïnes, es formen gràcies a la capacitat que tenen les molècules de bacterioclorofil·la d'interaccionar entre elles. Aquesta agregació s'ha observat tant *in vivo* (Brune *et al.*, 1987a; 1988; Hildebrandt *et al.*, 1994) com *in vitro* (Krasnovsky *et al.*, 1966; Krasnovsky i Bystrova, 1980; Olson i Pedersen, 1988; 1990; Uehara *et al.*, 1991, 1994; Uehara i Olson, 1992; Miller *et al.*, 1993a; Chiefari *et al.*, 1995). Malgrat els models proposats per l'agregació de les molècules de BCl són diversos tots ells es basen en la intervenció dels grups 3^l-hidroxil, 13^l-ceto i l'àtom central de magnesi (Bystrova *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1983; Lutz i Brackel, 1988; Blankenship *et al.*, 1988; Nozawa *et al.*, 1993, 1994; Holzwarth and Schaffner, 1994). De fet, l'estat d'agregació, l'arranjament i l'orientació de les molècules de BCl dins el clorosoma ha estat objecte d'una intensa discussió en els darrers anys, proposant-se diferents models per explicar-ne la correcta orientació i distribució (Brune *et al.*, 1987b; Brune *et al.*, 1988; Nozawa *et al.*, 1991a, b; 1992; 1993, 1994; Matsuura *et al.*, 1993) (Figura 1.3.D). Aquesta orientació específica sembla clau a l'hora d'optimitzar i canalitzar el fluxe d'excitació cap al CR (Griebenow i Holzwarth, 1989; Mimuro *et al.*, 1989; Causgrove *et al.*, 1990; Griebenow *et al.*, 1991; Alden *et al.*, 1992; Matsuura *et al.*, 1992).

A més de les molècules de BCl, els clorosomes contenen quantitats variables de carotenoides com a pigments antena accessoris (Liaaen-Jensen *et al.*, 1964; Liaaen-Jensen, 1965; Liaaen-Jensen i Andrewes, 1972; Schmidt, 1980) (Taula 1.3). La funció d'aquests pigments seria tant la de contribuir en la captació de llum augmentant l'interval de longituds d'ona per l'absorció com la de facilitar la transferència de l'energia captada a les molècules de BCl (Cogdell *et al.*, 1994). Una tercera funció d'aquests pigments seria la de fotoprotecció davant radicals reactius de l'oxigen. En les espècies verdes dels bacteris verds del sofre els principals carotenoides són el Cbt i el OH-Cbt, tot i que també poden trobar-se altres carotens minoritaris. En la fracció clorosòmica de *Chlorobium limicola*, el Cbt representa un 69%, i el Nrp i el Lcp el 21% i el 8%, respectivament (Schmidt, 1980). En les espècies marrons els principals carotenoides són l'Isr i el β -Isr (Liaaen-Jensen *et al.*, 1964; Liaaen-Jensen, 1965). La localització dels carotenoides entre la xarxa complexa de molècules de BCl es desconeix pel moment, però hom els suposa molt propers a les BCl's atès que s'ha de donar la transferència d'energia entre ambdós tipus de pigments (Frank i Cogdell, 1993; Frank i Christensen, 1995).

Els clorosomes, a més, contenen BCl *a*, que forma una làmina basal –*baseplate*– en contacte amb la superfície d'unió del propi clorosoma amb la membrana citoplasmàtica. Aquesta làmina és comuna tant en els bacteris verds del sofre com en els bacteris verds filamentosos, existint només lleugeres diferències pel que fa al seu màxim d'absorció *in vivo* –792 nm a *Chloroflexus* (Feick i Fuller, 1984) i 794 nm a *Chlorobium* (Gerola i Olson, 1986)–. La BCl *a* clorosòmica no té una funció d'antena, sinó que actua com a intermediari en la transferència d'energia des de les molècules antena del clorosoma als CR en la membrana (van Dorssen *et al.*, 1986).

En els clorosomes poden trobar-s'hi també quantitats significatives de proteïnes (Schmidt, 1980; Olson, 1980a; Feick i Fuller, 1984; Stolz *et al.*, 1990; Wullink *et al.*,

Taula 1.3. Principals carotenoides dels bacteris verds del sofre (segons Liaaen-Jensen *et al.*, 1964; Schmidt, 1980; Imhoff, 1995).

Table 1.3. Main carotenoid pigments observed in green sulfur bacteria (according to Liaaen-Jensen *et al.*, 1964; Schmidt, 1980; Imhoff, 1995).

	Carotenoide	Tipus	Contingut* (%)
Espècies verdes			
	Clorobactè	arílic	70–90
	OH-Clorobactè	arílic	1–5
	β-carotè	alifàtic	< 1
	γ-carotè	alifàtic	1–5
	Licopè	alifàtic	< 1
	Neurosporè	alifàtic	< 20
Espècies marrons			
	Isorenieratè	arílic	> 90
	β-Isorenieratè	arílic	1–5

*: Els continguts varien en funció de l'espècie implicada.

*: Contents are variable depending on the species involved.

1991). Aquests pèptids són de baix pes molecular (<50 kDa) i en un principi van relacionar-se amb tasques estructurals, proposant-se la possible localització dels mateixos al interior dels elements cilíndrics (Feick i Fuller, 1984; Stolz *et al.*, 1990). Les principals proteïnes dels clorosomes de *Chlorobium limicola* i *C. tepidum* són dos pèptids de 7,5 i 6,3 kDa (Gerola i Olson, 1986; Gerola *et al.*, 1988; Wagner-Huber *et al.*, 1988; 1990; Chung *et al.*, 1994) El primer es va relacionar en un principi com un constituent de la làmina basal que actuava com a unió entre el clorosoma i les proteïnes FMO (Højrup *et al.*, 1991). El pèptid de 6,3 kDa va mostrar analogia amb un pèptid de 5,7 kDa trobat a *Chloroflexus aurantiacus* i se li ha suposat una possible funció estructural. Els clorosomes de *Chlorobium limicola* contenen altres proteïnes de pes molecular entre 9 i 38 kDa (Gerola i Olson, 1986). A *C. phaeobacteroides* s'ha detectat un únic pèptid de 34,5 kDa a més de l'esmentat de 7,5 kDa (Stolz *et al.*, 1990). Recentment Chung *et al.* (1994) han aïllat fins a vuit pèptids en els clorosomes de *C. tepidum*.

Les funcions que desenvolupen aquestes proteïnes en els clorosomes no estan prou clares. Si bé en un principi es pensava que actuaven facilitant l'estabilitat de les molècules de BCl en els elements cilíndrics, actualment aquest paper està virtualment descartat. L'observació que les estructures polimèriques de bacterioclorofil·la són estables sense la participació de proteïnes ha portat a l'acceptació general que l'organització interna del clorosoma es basa en interaccions pigment-pigment i no pigment-proteïna (Griebenow i Holzwarth, 1990; Holzwarth *et al.*, 1990, 1992; Holzwarth and Schaffner, 1994). Malgrat això, alguns autors han detectat canvis en la

relació pigment-proteïna dels clorosomes davant variacions en les condicions de llum, fet que ha portat a pensar en algun tipus de relació entre les diferents pèptids i els oligòmers pigmentaris (Højrup *et al.*, 1991; Zuber i Brunisholz, 1991; Niedermeier *et al.*, 1992; Lehmann *et al.*, 1994). Blankenship *et al.* (1995) proposen que Csm A, el principal polipèptid clorosòmic, es troba localitzat en la membrana del clorosoma de tal manera que penetra en la seva matriu i interacciona amb els elements cilíndrics de bacterioclorofil·la, estabilitzant-los. Aquest contacte seria el responsable del trencament dels cilindres en petits dominis d'aproximadament 30 molècules observat en estudis espectroscòpics (Miller *et al.*, 1991). La resta de polipèptids observats no estarien associats amb l'antena i s'ha suggerit que intervindrien en l'estabilització de la morfologia el·lipsoidal dels clorosomes (Miller *et al.*, 1993b; Niedermeier *et al.*, 1994). Apart d'aquest paper semi-estructural, s'ha proposat també la seva contribució en el transport dels pigments i els seus precursors des de la membrana citoplasmàtica, on suposadament es sintetitzen els pigments, fins la matriu clorosòmica (Oelze i Golecki, 1995).

1.2.1.2. Proteïnes FMO, membrana citoplasmàtica i centres de reacció

Tot i les semblances existents entre el contingut pigmentari i l'estructura dels complexos antena dels bacteris verds del sofre i dels bacteris verds filamentosos, l'organització de la resta de l'aparell fotosintètic entre ambdós grups és diferent (Figura 1.3.E). La principal diferència rau en la presència en els primers de complexos pigment-proteïna, distribuïts en una xarxa cristal·lina entre la làmina basal del clorosoma i la membrana citoplasmàtica que conté els centres de reacció (Olson i Romano, 1962; Olson, 1966; Olson *et al.*, 1969a, b; Olson, 1980b). Aquests complexos, anomenats Fenna-Matthews-Olson (FMO), són trímers proteics, solubles en aigua, que presenten 7 molècules de BCl α associades a cadascuna de les subunitats proteïques (Thornber i Olson, 1968; Olson, 1971, 1978, Fenna *et al.*, 1974). Matthews i col·laboradors van resoldre l'estructura precisa d'aquest complex proteic a una resolució de 1,9 Å mitjançant cristal·lografia de raigs X (Fenna i Matthews, 1975; Matthews *et al.*, 1979; Tronrud *et al.*, 1986, Tronrud i Matthews, 1993). La funció d'aquests complexos és acceptar l'energia d'excitació de la làmina basal del clorosoma i transferir-la als CR (Sybesma i Olson, 1963; Olson *et al.*, 1976). L'absència de les proteïnes FMO en els bacteris verds filamentosos determina que l'energia d'excitació passi directament de la BCl α de la làmina basal als complexos fotosintètics associats a la membrana citoplasmàtica (Betti *et al.*, 1982; Brune *et al.*, 1987b; Mimuro *et al.*, 1989; Causgrove *et al.*, 1990).

La membrana citoplasmàtica dels bacteris verds del sofre conté els CR i els seus pigments antena associats. Aquesta distribució és idèntica a la que es troba en els bacteris verds filamentosos malgrat que els elements fotosintètics són diferents en ambdós grups. Les principals diferències es troben tant en les molècules antena associades al CR –BCl α 810 en els bacteris verds del sofre i BCl α 808-866 en els bacteris verds filamentosos– com en els components de la cadena transportadora d'electrons. En els bacteris verds del sofre, el donador primari d'electrons és un dímer de BCl α (P840) i l'acceptor primari un pigment similar a la Cl α (BCl 663)

(Braumann *et al.*, 1986; van de Meent *et al.*, 1992; Feiler *et al.*, 1994; Feiler i Hauska, 1995). Els donadors secundaris d'electrons són del tipus quinona, citocroms dels tipus *b* i *c*, i proteïnes Fe-S similars als del fotosistema I (Blankenship, 1985; Büttner *et al.*, 1992a, b; Golbeck, 1993; Meyer i Donohue, 1995). Els bacteris verds filamentosos, en canvi, posseïxen un CR similar, tant estructuralment com funcional, al dels bacteris vermells (Bruce *et al.*, 1982; Pierson i Thornber, 1983; Feick i Fuller, 1984). L'energia d'excitació cedida per el parell B808-866 és captada per un dímer de BCl *a* (P865) que actúa de donador primari d'electrons (Bruce *et al.*, 1982; Feick *et al.*, 1995). L'acceptor primari és una bacteriofeofitina *a* (Kirmaier *et al.*, 1983; Feick *et al.*, 1995). La cadena transportadora d'electrons conté citocroms dels tipus *b* i *c*, centres Fe-S i menaquinones (Vasmel i Amesz, 1983; Feick *et al.*, 1995).

1.2.1.3. Transferència d'energia

En els clorosomes dels bacteris fotosintètics verds l'energia d'excitació es transfereix a través d'un procés no radiatiu on intervenen interaccions electrostàtiques entre els àtoms de les molècules donadores i receptores. Això dóna lloc a una migració de l'energia entre els grups i orbitals de les molècules antena. Aquesta migració no és uniforme sinó que es dóna a l'atzar, en un procés anomenat *random walk* (Zuber *et al.*, 1987). El mecanisme pel qual té lloc la transferència de l'energia va ser descrit per Förster (Förster, 1948, 1965). Es pot trobar més informació sobre aquesta teoria així com la seva aplicació en diferents sistemes fotosintètics a Knox (1975), van Grondelle (1984), van Grondelle i Amesz (1986), Geacintov i Breton (1987), Vos *et al.* (1987) i van Grondelle *et al.* (1994).

El mecanisme de transferència d'energia depèn del tipus de molècules implicades, de les seves dimensions i orientació i de l'energia dels orbitals electrònics. A més, en aquest procés resulten fonamentals dos factors. En primer lloc s'ha de donar un cert solapament entre l'espectre de fluorescència de la molècula donadora amb l'espectre d'absorció de la receptora. En aquest sentit, i degut al desplaçament espectral entre fluorescència i absorció (desplaçament de Stokes), el solapament és òptim si el màxim d'absorció de la molècula receptora es troba lleugerament desplaçat cap el vermell respecte el de la donadora. D'aquesta manera, l'excitació es transfereix cap a molècules amb màxims d'absorció progressivament desplaçats cap el vermell, i s'acumula en els pigments que tenen l'energia d'excitació més baixa. S'ha suggerit que en els clorosomes bacterians aquestes molècules es localitzen més properes a la membrana la qual cosa afavoriria la canalització de l'excitació cap els CR (Otte *et al.*, 1991, 1993; van Noort *et al.*, 1994).

Un segon factor que afavoreix l'optimització de la transferència d'energia és la distància entre les molècules (10-20 Å) i la seva orientació, ja que requereix del contacte directe entre els anells i transicions electròniques π - π (Förster, 1948, 1965). En aquest sentit, l'antena fotosintètica dels bacteris verds és extremadament eficient ja que tant el seu empaquetament compacte com la seva orientació espacial contribueixen a minimitzar la dissipació de l'energia durant la transferència. Una

vegada l'excitació arriba al CR aquesta és captada per una forma especial de BCl (el parell especial o *special pair*), químicament reactiva, que transfereix un electró a un acceptor primari, iniciant-se les reaccions químiques del procés fotosintètic.

1.3. OBJECTIUS I ESTRUCTURA DEL TREBALL

Els treballs realitzats fins el moment sobre els pigments fotosintètics de les Clorobiàcies han estat realitzats bàsicament des d'una òptica bioquímica. Tot i que aquests estudis són necessaris per conèixer l'estructura i funcionament de cada tipus de pigment dins l'aparell fotosintètic, es troben mancats de la funcionalitat necessària per extrapolar les conclusions obtingudes i aplicar-les a les poblacions naturals. Aquesta limitació deriva del fet que sovint no es tenen en compte l'ampli ventall de condicions de creixement en les que es troben les poblacions dins el seu hàbitat natural. D'altra banda, un estudi sobre la fotoadaptació pigmentària dels bacteris fotosintètics al seu hàbitat natural que no tingui en compte les característiques pròpies de cada pigment, el funcionament de l'aparell fotosintètic o els sistemes de regulació que els governen, resultaria tal vegada incomplet.

1.3.1. Objectius i pla de treball

El principal objectiu en iniciar aquest treball d'investigació fou el d'aprofundir en el coneixement de l'elevada diversitat pigmentària que mostraven els bacteris verds del sofre i la naturalesa dels mecanismes d'adaptació d'aquests bacteris a les baixes intensitats de llum. El punt d'arrancada fou el disseny d'un mètode de cromatografia líquida d'alta resolució que permetés separar acuradament les diferents bacterioclòròfil·les i els seus homòlegs i que solventés les limitacions dels mètodes espectrofotomètrics. Una vegada desenvolupat, aquest mètode va permetre obtenir una llibreria de patrons d'homòlegs per diferents soques de laboratori de bacteris verds del sofre. En base a la gran variabilitat existent pel que fa aquests patrons, hom va plantejar-se un seguit de qüestions sobre la fisiologia i ecologia pigmentària d'aquests bacteris i que van esdevenir objectius centrals de la investigació. En primer lloc s'obriren interrogants sobre el valor taxonòmic del patró d'homòlegs present en una determinada espècie. Si aquest fos elevat, caldria després preguntar-se quina utilitat se'n pot desprendre i si pot o no utilitzar-se en com a caràcter distintiu i per tant, classificador.

Si el patró d'homòlegs no tenia valor taxonòmic calia qüestionar si al menys està o no subjecta a canvis i quins són els paràmetres que els regulen. D'altra banda també calia veure quin paper juguen els homòlegs de les diferents bacterioclòròfil·les en l'excel·lent adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum. Finalment quedava per resoldre tot allò relacionat amb els patrons d'homòlegs presents en les poblacions naturals de bacteris verds del sofre; d'especial interès era conèixer si existien diferències pigmentàries entre poblacions d'una mateixa espècie desenvolupades en ecosistemes diferents i ebrinar-ne les causes.

Una vegada establerts els objectius, el pla de treball es va estructurar de manera que es complementessin i coordinessin els aspectes fisiològics amb els ecològics, combinant el treball de laboratori amb el de camp. El treball aporta nous aspectes tant de la fisiologia pigmentària dels bacteris verds del sofre al laboratori –amb especial èmfasi al paper dels diferents homòlegs de les BCl en l'adaptació lumínica– com de la seva constatació en condicions naturals i ofereix una visió general i a l'ensems acurada de l'adaptació pigmentària d'aquests bacteris sota diferents condicions de creixement.

1.3.2. Estructura del treball

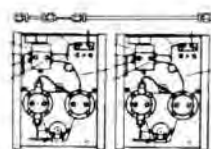
La present memòria està estructurada en tres blocs. Cadascun d'aquests consta d'una introducció, resultats i discussió i per tant poden ser llegits separatament. Al primer bloc (Capítol 3) es presenta el mètode de cromatografia líquida d'alta resolució dissenyat per obtenir la separació de les diverses bacterioclorsofil·les i els seus corresponents homòlegs. A més, es presenta un estudi d'exploració sobre els patrons d'homòlegs d'una gran varietat d'espècies pertanyents als bacteris verds del sofre.

El segon bloc (Capítol 4) s'ocupa de la fisiologia de la fotoadaptació pigmentària dels bacteris verds del sofre a intensitats baixes de llum. En concret, es recullen les investigacions realitzades sobre diferents espècies de bacteris verds del sofre per tal d'esbrinar el paper dels diferents homòlegs de la BCl *c* i *e* en l'adaptació a intensitats sub-òptimes (1 i $0,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i crítiques ($0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de llum, tant a nivell cel·lular com de les diferents fraccions sub-cel·lulars fotosintètiques.

L'estudi de les poblacions naturals de bacteris fotosintètics verds des del punt de vista pigmentari es recull al tercer bloc (Capítol 5). El principal objectiu d'aquests estudis ecològics fou el de constatar els resultats obtinguts al laboratori sobre el paper dels homòlegs de les diferents bacterioclorsofil·les en l'adaptació a climes lumínics baixos. En concret, es presenten un seguit de resultats sobre l'evolució de la composició pigmentària de dues poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* durant els períodes de creixement estacional a les cubetes III i IV de l'estany de Banyoles, d'una comunitat formada per *Pelodictyon clathratiforme* i "Chlorochromatium aggregatum" a l'estanyol Coromina, així com la diversitat pel que fa als patrons pigmentaris de diferents poblacions de bacteris fotosintètics verds desenvolupades sota diferents condicions de creixement.

En el capítol sisè es discuteix sobre les causes de l'elevada heterogeneïtat pigmentària que exhibeixen els bacteris verds del sofre i les implicacions eco-fisiològiques que se'n desprenen. Finalment, el capítol setè serveix per exposar les conclusions obtingudes i proposar futures línies d'investigació obertes a partir de les investigacions portades a terme. La Tesi es complementa amb un capítol on es detallen els materials i mètodes utilitzats durant la investigació (Capítol 2) i un apartat final on es recullen les referències bibliogràfiques citades al text.

2. MATERIAL I MÈTODES



2.1. EQUIPAMENT I REACTIUS

2.1.1. Equipament

Durant el desenvolupament de la investigació s'ha utilitzat de forma rutinària l'equipament que es llista a continuació. Els aparells emprats ocasionalment en una tècnica concreta es citen en l'apartat corresponent.

Agitadors magnètics Mivar ALC
Aparell d'ultrafiltració d'aigua Millipore models Milli-Q i Milli-RO
Autoclaus Selecta Autotester models 437-G i 437-P
Balança analítica Salter model EB60
Balança analítica Sartorius models R200D i PTI200
Banyts termostàtics Selecta Tectron models 473-100 i Unitronic 3200R
Bomba peristàltica Pharmacia Biotech, model P-1
Bombes d'HPLC Waters model 510
Centrifuga de sobretaula Selecta Centromix
Centrifuga de sobretaula Nanofuge Hoefer Scientific Ins.
Centrifuga refrigerada d'alta velocitat SORVALL model RC-5B
Condicionador de Solvents Pharmacia Biotech model 2256
Detector de fotodíodes Waters 996
Espectrofotòmetre MILTON ROY model MR3000
Injector manual Rheodyne 7125
Lupa binocular Nikon model SMZ-1
Microscopi Zeiss-Axioscop model HDIC
Oxímetre Yellow-Spring Instruments
pH-metre CRISON models 2000 i 506
Programari Millennium 2010 Chromatography Manager © versió 2.0 (Waters-Millipore))
Rotovaporador (centrifuga de buit) BÜCHL model R-114
Sonicador Braun T-Labsonic 2000
Vortex TechnoKartell model TK3S

2.1.2. Reactius

Els productes químics utilitzats de forma general han estat reactius de grau analític de diferents companyies comercials (Panreac, Probus, Fluka, Sigma Chemicals Co., Merck, Riedel-de Haën i Scharlau). Els productes d'ús més específic es detallen en aquells apartats on es fa referència a la tècnica on es van utilitzar.

2.2. MATERIAL BIOLÒGIC I MÈTODES D'AÏLLAMENT I CULTIU

2.2.1. Microorganismes

Per la realització del treball d'investigació s'han utilitzat diferents soques de bacteris fotosintètics verds del sofre, bacteris verds filamentosos, bacteris vermells del sofre (Cromatiàcies) i de les Heliobacteria. A la taula 2.1. es llisten les diferents soques utilitzades durant l'estudi.

Taula 2.1. Soques de bacteris fotosintètics utilitzades durant l'estudi. Les soques provenien de la col·lecció oficial de la Universitat de Girona (UdG), de la Deutschland Sammlung für Mikroorganismen (DSM) i de la American Type Culture Collection (ATCC), excepte (*) cedides per la Dra. M. Miller (Odense University, Dinamarca) i (**) cedides pel Dr. M. T. Madigan (Southern Illinois University, USA).

Table 2.1. Photosynthetic bacterial strains used in this study. Strains were supplied by the University of Girona (UdG) culture collection, the Deutschland Sammlung für Mikroorganismen (DSM) and the American Type Culture Collection (ATCC), except (*) gently provided by Dr. M. Miller (Odense University, Denmark) and (**) Dr. M. T. Madigan (Southern Illinois University, USA).

Espècie	Soca	Origen
Bacteris verds del sofre		
Espècies verdes		
<i>Chlorobium limicola</i>	DSM 248	Col.lecció
<i>C. limicola</i> f. <i>thiosulfatophilum</i>	DSM 249	Col.lecció
<i>C. chlorovibrioides</i>	UdG 6027	La Massona
<i>C. vibrioforme</i>	UdG 6026	La Massona
<i>C. vibrioforme</i> f. <i>thiosulfatophilum</i>	NCIB 8327	Col.lecció*
<i>C. tepidum</i>	ATCC 49652	Col.lecció*
<i>Pelodictyon clathratiforme</i>	UdG 7504	Coromina
Espècies marrons		
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	UdG 6030	Cubeta III
<i>C. phaeovibrioides</i>	UdG 6035	La Massona
<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i>	UdG 7502	Höllerersee
<i>P. phaeum</i>	UdG 7503	La Massona
Bacteris verds filamentosos multicel·lulars		
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Ok-70-fl	Col.lecció*
Cromatiàcies		
<i>Chromatium minus</i>	UDG 2005	Vilar
<i>C. vinosum</i>	ATCC 17899	Col.lecció
<i>C. buderii</i>	ATCC 25588	Col.lecció
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	UDG 3502	-
Heliobacteris		
<i>Heliobacillus mobilis</i>	-	Col.lecció**

2.2.2. Purificació i aïllament de bacteris fotosintètics del sofre

Totes les soques utilitzades, excepte aquelles que provenien de col·leccions oficials, es van aïllar a partir de poblacions naturals mitjançant la tècnica de van Niel (1971). Aquesta tècnica consta de tres fases: enriquiment, aïllament i identificació, i cultiu.

2.2.2.1. Enriquiment

L'enriquiment es realitzava a partir de les mostres de camp en ampolles de vidre de 1 litre de capacitat, plenes de l'aigua de la fondària on es trobava la màxima densitat cel·lular i tancades hermèticament. Les ampolles es posaven a incubar a la llum –normalment bombetes incandescentes de 100W o tubs fluorescents– prèvia addició de H_2S (0,5 a 1 mmol l^{-1}). La intensitat de llum i la concentració de sulfhídric es variaven en funció de l'espècie que es pretenia aïllar. Cada 48 h s'afegia sulfhídric als enriquiments i se'n comprovava l'estat visualment i al microscopi òptic. Quan la densitat cel·lular era apreciable –després d'uns 10 a 15 dies d'incubació– es procedia a l'aïllament.

2.2.2.2. Aïllament i identificació

Per l'aïllament s'utilitzava la tècnica de dilucions en agar. La tècnica consisteix en la inoculació, en dilució seriada, del cultiu enriquiment en tubs que contenen medi Pfennig (Pfennig, 1965; veure apartat 2.2.2.3) i agar tou al 3%. El creixement en l'agar dona lloc a colònies que, prèvia identificació, són recollides i re-inoculades en medi fresc.

Per iniciar la sèrie es col·locaven en un bany a 100°C 5 o 6 tubs contenint 3 ml d'agar estèril i rentat 6 vegades. Una vegada fos l'agar, es portaven els tubs a un bany a 45°C i s'afegien a cadascun d'ells 7 ml de medi Pfennig. El primer tub de la sèrie s'inoculava amb un volum variable del cultiu d'enriquiment. A partir del primer tub inoculat es realitzava el banc de dilucions fins acabar amb tota la sèrie. Els tubs es dipositaven en un bany amb gel per que solidifiqués l'agar i s'hi afegia una capa de parafina estèril fosa d'uns 3 cm de gruix. Finalment, es gassejava amb nitrogen la cambra d'aire que restava en els tubs i es posaven a les fosques durant 24 h. Passat aquest temps s'incubaven sota les condicions apropiades.

Una vegada crescudes les colònies, es triaven les més ben aïllades i després de retirar la parafina a la flama, s'aspiraven amb un capilar de vidre i es dipositaven en un vialet amb medi Pfennig. La identificació es realitzava segons els aspectes morfològics de les diferents espècies (forma, longitud i diàmetre) i el seu contingut en pigments fotosintètics. El microscopi utilitzat ha estat un Zeiss Axioscop HDIC, equipat amb contrast de fases i epifluorescència, i acoplat a un sistema de fotografia i video. La determinació dels pigments fotosintètics es va realitzar seguint els mètodes analítics detallats en l'apartat 2.3. Confirmada la identificació de l'espècie, s'inoculava un tub amb medi Pfennig fresc i es repetia l'aïllament mitjançant una segona sèrie de dilució. Una vegada assegurada la puresa de les colònies, s'inoculava una d'elles en una ampolla amb medi fresc i s'incubava sota les condicions apropiades.

2.2.2.3. Cultiu de bacteris fotosintètics del sofre

El creixement de *Chlorobium limicola*, *C. phaeobacteroides*, *Pelodictyon (P) clathratiforme* i *P. phaeoclathratiforme* es va dur a terme en medi Pfennig (Pfennig, 1965), modificat segons Trüper i Pfennig (1992). Aquest medi és un medi mineral

suplementat amb una solució de micronutrients i vitamina B₁₂. La composició d'aquest medi (en g/l) es detalla a continuació:

- A: *Solució de sals minerals*

- Agua destil.lada	1,00 l
- KH ₂ PO ₄	0,34 g
- NH ₄ Cl	0,40 g
- KCl	0,34 g
- MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 g
- CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,30 g

- B: *Solució de micronutrients (SL10)*

- Aigua destil.lada	1,0 l
- HCl (37%)	8,5 ml
- FeCl ₂ ·4H ₂ O	1,5 g
- H ₃ BO ₃	6,0 mg
- CoCl ₂ ·6H ₂ O	190,0 mg
- MnCl ₂ ·4H ₂ O	100,0 mg
- ZnCl ₂	70,0 mg
- Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36,0 mg
- NiCl ₂ ·6H ₂ O	24,0 mg
- CuCl ₂ ·2H ₂ O	2,0 mg

Les sals es dissolien en l'ordre donat i s'esterilitzava la solució a l'autoclaui. La solució és estable a temperatura ambient.

- C: *Solució font de carboni:*

- Aigua destil.lada	35,0 ml
- NaHCO ₃	3,3 g

Esterilitzar a l'autoclaui en ampolles hermèticament tancades. El contingut d'una ampolla s'abocava en dos litres de medi.

- D: *Solució de H₂S:*

- Aigua destil.lada	250,0 ml
- Na ₂ S·9H ₂ O	6,0 g
- NaCO ₃ anhidre	2,3 g

L'aigua es desgasificava per ebullició durant 15 min i es deixava refredar a temperatura ambient sota atmosfera de CO₂. Es dissolien les sals i es repartia la solució en tubs de vidre de 20 ml tancats hermèticament que s'esterilitzaven a l'autoclaui.

- *Preparació per 2 litres de medi*

El medi es preparava en un recipient especialment dissenyat per a tal efecte. Una vegada preparada la solució A, s'autoclavava i es deixava refredar a temperatura ambient i sota pressió de CO₂. Posteriorment s'afegien 2 ml de la solució B, el contingut d'una ampolla de la solució C i dos tubs de la solució D. Finalment, el pH s'ajustava a 6,7 amb NaOH 1M estèril i s'afegien 2 ml d'una solució de vitamina B₁₂ (20 µg l⁻¹). El medi es repartia en ampolles de vidre estèrils i tancades hermèticament i es guardava a temperatura ambient.

Per les espècies marines –*Chlorobium chlorovibrioides*, *C. phaeovibrioides*, *C. vibrioforme*, *C. vibrioforme* f. *thiosulfatophilum* i *Pelodictyon phaeum*– s'utilitzava el mateix medi mineral però afegint NaCl estèril en una concentració final del 2%. L'esterilització del NaCl es realitzava al forn Pasteur durant 2 h a 160°C. En el cas de *C. vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*, la concentració final de sulfhídric es reduïa a la meitat (0,5 mmol l⁻¹) i s'hi afegien 2 ml d'una sol.lució 100 mmol l⁻¹ de tiosulfat sòdic.

- *Cultiu de Chlorobium tepidum*

Pel creixement d'aquesta espècie termòfila s'utilitzava el medi mineral descrit per Wahlund *et al.* (1991). El medi és una modificació del medi Pfennig tradicional amb la incorporació de EDTA di-sòdica, tiosulfat com a font de poder reductor i resazurina com a solució indicadora de Redox. El pH final del medi era de 6,9 i la temperatura d'incubació de 45°C.

2.3. MÈTODES ANALÍTICS DE PIGMENTS FOTOSINTÈTICS

2.3.1. Anàlisi espectrofotomètrica

Els bacteris fototròfics del sofre es diferencien entre d'altres trets morfològics i fisiològics pels pigments fotosintètics que posseeixen. Els bacteris vermells contenen BCl *a* tant com a pigment antena com als centres de reacció, i carotenoides dels grups 1, 3 i 4 (entre els que destaca l'okenona, l'espililoxantina, la rodopina i el rodopinal). Els bacteris verds del sofre contenen BCl *c*, *d* o *e* i el clorobactè (Cbt) o l'isorenieratè (Isr) com a principals carotenoides. Cadascun d'aquests pigments presenta, tant *in vivo* com en solvents orgànics, dos o més màxims d'absorció característics. En extractes purs la mesura d'aquests màxims permet la identificació del tipus de pigment (Taula 2.2). En extractes mixtes la identificació es complica degut al solapament entre els espectres d'absorció dels diferents pigments.

2.3.1.1. Anàlisi qualitativa

Una primera anàlisi es basava en la realització d'espectres d'absorció *in vivo*. Els espectres es realitzaven directament a partir d'una alíquota del cultiu o d'una mostra natural. Si la mostra a analitzar no presentava una densitat cel.lular elevada es prenia un volum que oscil.lava entre 10 i 50 ml i es centrifugava a 10.000

Taula 2.2. Màxims d'absorció dels principals pigments fotosintètics analitzats. sd: sense determinar.**Table 2.2.** Absorption maxima of the different photosynthetic pigments studied. sd: not determined.

Pigment	λ màx. <i>in vivo</i> (nm)	λ màx. solvents orgànics ^a (nm)	
		Cl-BCl	Feof-BFeof
a) Clorofil·les			
Cl <i>a</i>	678-682	430-432,663-666	408-412, 680-685
Cl <i>b</i>	628-632	454-456,645-650	430-435, 655-660
b) Bacterioclorigil·les			
BCl <i>a</i>	375,590,800-810,830-890	362-365,577,767-775	355-359,525,745-750
BCl <i>b</i>	400,605,835-850,1015-1035	368,580,794	365-370,528,770-776
BCl <i>c</i>	335,460,745-760	430-436,663-668	408-410,547,665-669
BCl <i>d</i>	325,450,725-745	427-429,654-656	406-429,505,655-658
BCl <i>e</i>	345,450-460,710-725	465-475,648-654	440-445,534,654
BCl <i>g</i>	370,419,575,690,780-790	395-400,750-754	388,518,753 (437,665) ^b
e) Carotenoides			
Clorobactè	460	432-435,462,491-496	
OH-Clorobactè	460	432-435,462,491-496	
Espiril·loxantina	sd	465,494,526	
Licopè	sd	442-445,468-472,499-504	
Isorenieratè	505-515	430-432,453,480-485	
β -Isorenieratè	505-515	430-432,453,480-485	
Neurosporè	sd	413,436-439,465	
Okenona	570-590	460,488,516	
Rodopina	sd	445,472,504	
α -Carotè	sd	425,445,474	
β -Carotè	sd	425-429,449-452,475-482	
γ -Carotè	sd	435-439,461,491	

^a: Els màxims d'absorció depenen del solvent emprat en l'extracció. ^b: Producte de degradació de la BCl *g* amb característiques similars a la Cl *a* i la BCl *c*.

^a: Absorption maxima are strongly dependent of the extraction solvent used. ^b: BChl *g* degradation product with absorption properties resembling those of Chl *a*-BChl *c*.

rpm durant 30 minuts. El sediment de centrifugació es resuspensia en 1 ml de la mostra original i s'en realitzava l'espectre d'absorció. Malgrat que l'espectre obtingut presentava una certa dispersió de la llum degut a les cèl·lules –fenòmen de *scattering*–, aquest no es tenia en compte ja que l'identificació del pigment es realitzava en base al màxim d'absorció en la zona del vermell (Q_y), la posició del qual no es veia afectada per la terbolesa de la mostra.

2.3.1.2. Anàlisi quantitativa

A més de ser una eina útil en la taxonomia dels bacteris fotosintètics del sofre, la determinació dels pigments pot ser una bona estima de la biomassa de les poblacions de microorganismes fotosintètics (Takahashi i Ichimura, 1968; 1970; Abella, 1980; Montesinos, 1982; Guerrero *et al.*, 1985). L'anàlisi quantitativa es basa en una extracció dels pigments en solvents orgànics, la realització d'espectres d'absorció i el càlcul de les concentracions de pigment mitjançant l'aplicació de les fórmules de càlcul corresponents.

L'extracció dels pigments es realitzava amb un solvent orgànic (acetona, metanol, o mescles d'aquests). Degut a l'extrema sensibilitat de la majoria de pigments a la fotodegradació, totes les manipulacions dels extractes es van dur a terme sota llum dèbil i en tubs protegits de la llum amb paper d'alumini. L'extracció en cultius de laboratori es realitzava centrifugant un determinat volum del mateix a 12.000 rpm durant 30 min. El sediment de centrifugació es resuspensia mitjançant sonicació en acetona al 100%, es col·locava en un tub de vidre preservat de la llum i es guardava a -20°C durant 24 hores. Després d'aquest període, es centrifugava a 4.500 rpm durant 15 min i una alíquota del sobrenedant s'utilitzava per l'anàlisi espectrofotomètrica. En cas de cultius bacterians molt densos, passades les primeres 24 h es realitzava una segona extracció. Després de la sonicació, l'extracte es mantenia 2 h al congelador i es tornava a centrifugar. L'extracció es repetia fins que el sediment de centrifugació restava incolor.

Per l'extracció de pigments en mostres de camp s'utilitzava el mètode descrit per Guerrero *et al.* (1985). Un volum conegut de mostra es filtrava a través d'un filtre de nitrats de cel·lulosa Supor-450 de 47 mm de diàmetre i $0,45\ \mu\text{m}$ de tamany de porus (Gelman Science). El filtre es cobria prèviament amb una fina capa de MgCO_3 al 2,5 %, per evitar el col·lapsament ràpid del filtre i la degradació àcida dels pigments (Humphrey i Wooton, 1966; Montesinos, 1982). La capa de carbonat magnèsic que retenia el material particulat es resuspensia en 5 ml d'acetona al 100%. La resta de l'anàlisi seguia els punts esmentats anteriorment.

Per a la quantificació dels pigments, es realitzava un espectre d'absorció de la mostra des de 350 a 850 nm i es mesurava l'absorbància als diferents màxims del pigment a quantificar. Les concentracions es calculaven mitjançant les fórmules descrites per Smith i Benitez (1955), Montesinos (1982) i Takahashi i Ichimura (1968; 1970). Les concentracions dels diferents pigments venen donades en $\mu\text{g l}^{-1}$.

- *Clorofil·la a i bacteriocl·lorofil·les*

$$Cl\ a\ (\mu\text{g}\ \text{l}^{-1}) = [(15,6 (A_{665}-A_{830})) - (2,0 (A_{645}-A_{830})) - (0,8 (A_{630}-A_{830}))] F$$

$$BCl\ a\ (\mu\text{g}\ \text{l}^{-1}) = 25,2 (A_{772}-A_{830}) F$$

$$BCl\ c\ (\mu\text{g}\ \text{l}^{-1}) = 10,8 (A_{663}-A_{830}) F$$

$$BCl\ d\ (\mu\text{g}\ \text{l}^{-1}) = 10,2 (A_{654}-A_{830}) F$$

on: 15,6; 2,0 i 0,8 són els inversos dels coeficients d'extinció (en $\text{ml}\ \mu\text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) en acetona de la Cl *a* a 665, 645 i 630 nm, respectivament; 25,2 és l'invers del coeficient d'extinció (en $\text{ml}\ \mu\text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) estimat per la BCl *a* (a 772 nm i en acetona) = 39,7 $\text{l}\ \text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (Takahashi i Ichimura, 1970); 10,8 és l'invers del coeficient d'extinció (en $\text{ml}\ \mu\text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) de la BCl *c* (a 663 nm i en acetona) = 92,6 $\text{l}\ \text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (Stanier i Smith, 1960; Takahashi i Ichimura, 1970); 10,2 és l'invers del coeficient d'extinció (en $\text{ml}\ \mu\text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) de la BCl *d* (a 654 nm i en acetona) = 98 $\text{l}\ \text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ (Stanier i Smith, 1960; Takahashi i Ichimura, 1970); A_{830} mesura la terbolesa de la mostra i F és v/V , essent v el volum de l'extracte en ml i V el volum centrifugat (o filtrat) en litres.

Pel que fa la bacteriocl·lorofil·la *e*, la quantificació acurada d'aquest pigment no ha estat mai prou ben resolta degut a la manca d'un coeficient d'extinció propi. Tot i que tradicionalment s'ha utilitzat pel càlcul el mateix coeficient d'extinció que per la BCl *d* (Abella, 1980; Montesinos, 1982; Montesinos *et al.* 1983; Guerrero *et al.*, 1985), la seva aplicació no és del tot correcte degut a les diferències estructurals i espectrals entre ambdós pigments.

La presència en la BCl *e* d'un radical formil (-CHO) al carboni 7 és distintiva d'aquest pigment respecte les altres cl·lorofil·les bacterianes (Smith, 1994). La presència d'aquest radical a la Cl *b* i les similituds espectrals existents entre aquesta cl·lorofil·la i la BCl *e* –localització del màxim a la banda Soret i una dèbil força d'oscil·lació de la banda Q_y (Figura 2.1) – porten a pensar que els dos pigments es troben emparentats evolutivament (Otte *et al.*, 1993). Per tant, i atenent a les similituds apuntades, s'ha utilitzat pel càlcul de la concentració de BCl *e* el coeficient d'extinció de la Cl *b*. Aquest coeficient és igual a 52,5 $\text{l}\ \text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ a 648 nm i en acetona (segons Vernon (1960) a Rowan (1989)). Per tant, la fórmula emprada pel càlcul de la concentració de BCl *e* ha estat la següent:

$$BCl\ e\ (\mu\text{g}\ \text{l}^{-1}) = 19,05 (A_{648}-A_{830}) F$$

essent 19,05 l'invers del coeficient d'extinció esmentat (en $\text{ml}\ \mu\text{g}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$).

- *Carotenoides*

La concentració de carotenoides es va mesurar utilitzant en tots els casos un valor mitjà del coeficient d'extinció específic de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 3000$ (Liaaen-Jensen *et al.*, 1964; Montesinos, 1982, Schmidt, 1980). Pels diferents carotenoides s'ha tingut en compte un factor de correcció per la interferència de la bacteriocl·lorofil·la corresponent, BCl *c* pel Cbt, BCl *e* per l'Isr i BCl *a* per l'Okn.

$$\text{Cbt } (\mu\text{g l}^{-1}) = 3,33 \cdot ((A_{436} - A_{830}) - 1,25 (A_{663} - A_{830})) \cdot G \cdot F$$

$$\text{Isr } (\mu\text{g l}^{-1}) = 3,33 \cdot ((A_{468} - A_{830}) - 1,77 (A_{648} - A_{830})) \cdot H \cdot F$$

$$\text{Okn } (\mu\text{g l}^{-1}) = 3,33 \cdot ((A_{485} - A_{830}) - 0,05 (A_{772} - A_{830})) \cdot F$$

on: 3,33 és el factor resultant de l'aplicació de la conversió en μg i el Coeficient d'Extinció específic (en $\% \text{ cm}^{-1}$), A_{436} és l'absorbància del Cbt, A_{663} és l'absorbància de la BCl *c*, G és un factor de compensació entre els màxims d'absorció del Cbt ($G = A_{462}/A_{436} \approx 1,03$); A_{468} és el valor d'absorbància de l'Isr, A_{648} és l'absorbància de la BCl *e*, H és el factor de compensació entre els màxims d'absorció de l'Isr ($H = A_{453}/A_{468} \approx 1,03$); A_{485} és el valor d'absorbància de l'Okn, A_{772} és l'absorbància de la BCl *a*, A_{830} mesura la terbolesa de la mostra i F és v/V , essent v el volum de l'extracte en ml i V el volum centrifugat (o filtrat) en litres.

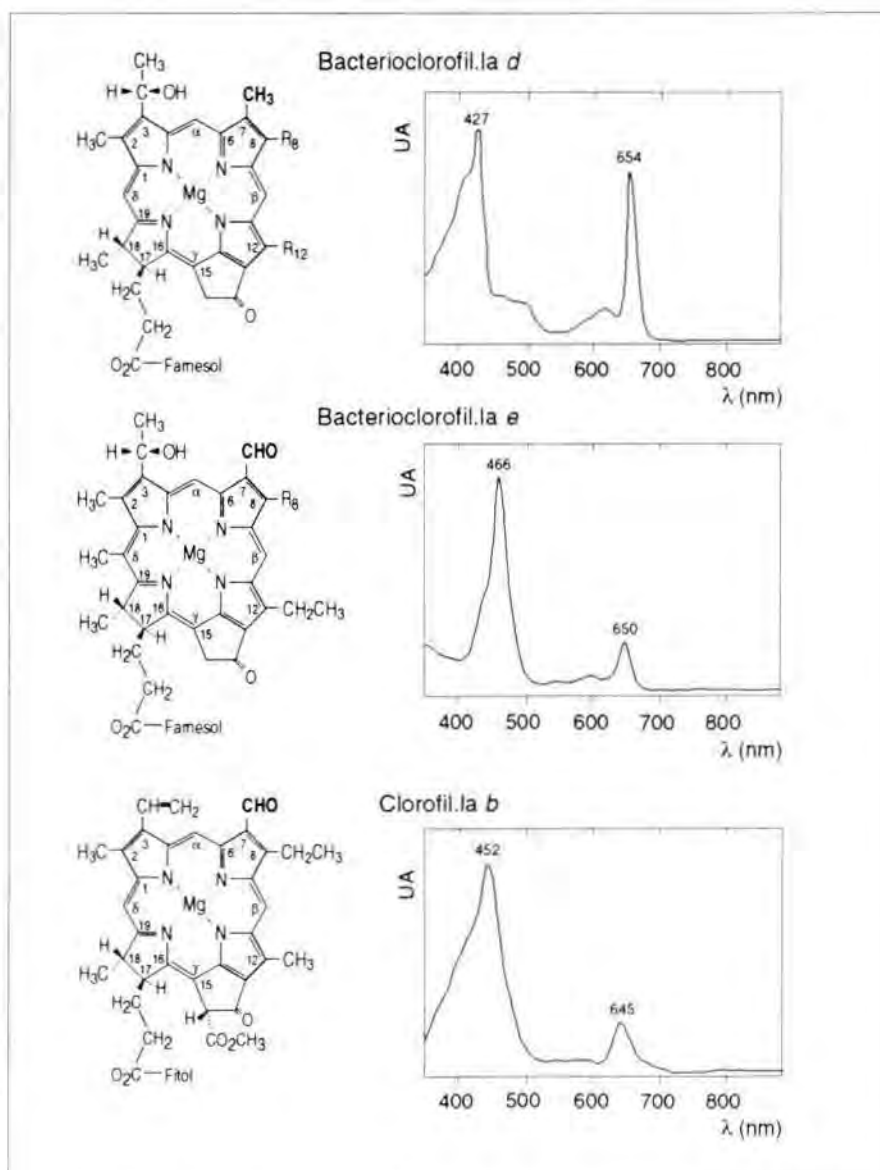


Figura 2.1. Estructures moleculars i espectres d'absorció en acetona de les BCl *d* i *e* i de la Cl *b*. Es de destacar la similitud espectral en la zona del vermell (regió Q_y) entre la BCl *e* i la Cl *b*.

Figure 2.1. Structural assignments and absorption spectra (in acetone) of BChl *d* and *e* and Chl *b*. Note that in the Q_y region BChl *e* and Chl *b* are spectrally similar.

2.3.2. Anàlisi per Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC)

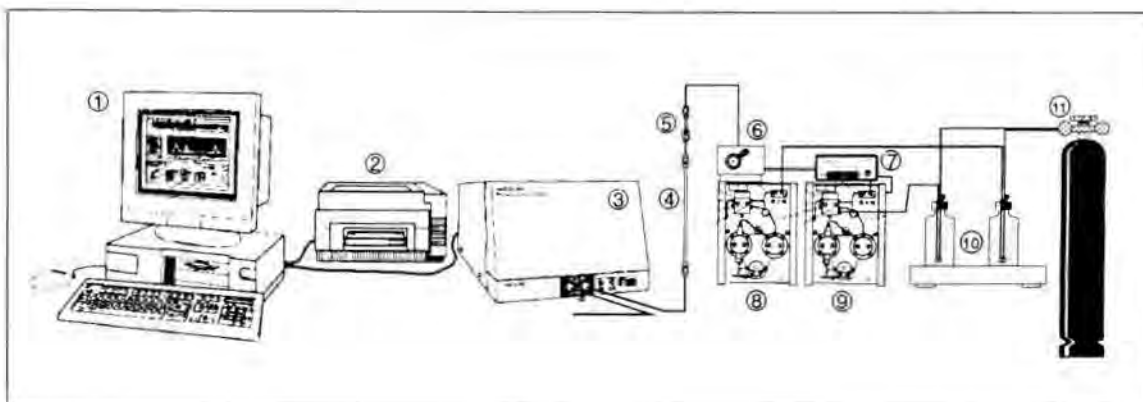
L'anàlisi de pigments fotosintètics mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (o HPLC, acrònim de *High Performance Liquid Chromatography*) s'ha desenvolupat en els darrers anys degut a la seva precisió i resolució en la separació i identificació d'aquests compostos (excel·lents revisions a Roy, 1987; Shioi, 1991). L'aplicació de la tècnica espectrofotomètrica tradicional, tot i oferir avantatges com la senzillesa i rapidesa de l'anàlisi, comporta un seguit de limitacions, sobretot quan s'estudien mostres heterogènies de pigments. El solapament dels espectres d'absorció dels diferents pigments porta a errors, tant en la seva identificació com en la posterior quantificació (Mantoura i Lewellyn 1983; Jacobsen i Rai, 1990).

El mètode de HPLC de fase reversa que s'ha desenvolupat pel present treball permet la separació, identificació i quantificació de la pràctica totalitat de pigments fotosintètics, tant de microorganismes eucariotes –fitoplàncton– com procariotes –cianobacteris, bacteris verds del sofre, Cromatiàcies, Cloroflexàcies i Heliobacteris–. Aquest mètode s'ha aplicat tant en els estudis fisiològics portats a terme al laboratori com en les anàlisis pigmentàries de poblacions naturals. Totes les anàlisis cromatogràfiques es van realitzar seguint les especificacions tècniques i analítiques que es detallen a continuació.

2.3.2.1. Instrumental i particularitats analítiques

El sistema de cromatografia líquida utilitzat estava compost bàsicament per dues bombes Waters model 510, un detector de fotodiodes (PDA) Waters model 996 i un injector manual Rheodyne model 7125 connectat a un bucle de càrrega Rheodyne model 7025 de 200 µl. Tot el sistema estava controlat per un ordinador personal NEC PowerMate 486/33i amb el programari Millennium 2010 Chromatography Manager © versió 2.0 de Waters, dissenyat especialment per l'adquisició i processat de les dades. La separació es realitzava amb una columna analítica Spherisorb C-18 S5 ODS2 de 250 mm de longitud i 4,6 mm de diàmetre, connectada a una pre-columna Spherisorb de 50 mm de longitud i 4,6 mm de diàmetre amb el mateix tipus de farciment que la columna principal. A la figura 2.2 es recullen les principals característiques tècniques dels components del sistema.

La tècnica de cromatografia líquida utilitzada va ser la de fase reversa. La fase normal es va descartar degut a la seva incompatibilitat amb els solvents utilitzats normalment per l'extracció de pigments fotosintètics. A més, la fase normal no ofereix una bona resolució en la separació de mostres molt heterogènies i d'altra banda, les fases estacionàries utilitzades solen presentar una elevada reactivitat (Roy, 1987). La fase mòbil emprada en la separació consistia en una mescla de dos solvents: el solvent A compost per metanol–acetat d'amoni 1M (70:30 vol/vol) i el solvent B compost per metanol–acetat d'etil–acetonitril (50:30:20 vol/vol/vol). Tots els solvents emprats eren de qualitat HPLC (Scharlau, HPLC grade). Per eliminar possibles impureses, els solvents eren filtrats prèviament a la seva utilització amb filtres de nylon GELMAN Science de 0.45 µm de tamany de porus. Una vegada



ÍTEM	DESCRIPCIÓ	TIPUS	CARACTERÍSTIQUES
1	Ordinador personal	NEC PowerMate 486/33i	Equipat amb el programari Millennium 2010 Chromatography Manager
2	Impressora	FUJITSU DX2100	Estàndard
3	Detector	Waters 996	Detector de Fotodiodes
4	Columna	Spherisorb ODS2 C-18 S5	Columna de 250 x 4,6 mm amb farciment de partícules de sílica C-18 de 5 µm
5	Pre-Columna	Spherisorb ODS2 C-18 S5	Pre-Columna de 50 x 4,6 mm amb farciment de partícules de sílice C-18 de 5 µm
6	Injecteur	Rheodyne 7125	Injecteur manual acoplat a un bucle de 200 µl
7	Controlador de bombes	Mòdul de Control Waters	Sistema Controlador de Gradients
8-9	Bombes	Waters 510	Bombes
10	Acondicionador Solvents	Pharmacia LKB 2256	Desgasificació continua amb He.
11	Bombona d'Heli	Estàndard	Alta Puresa

Figura 2.2. Característiques tècniques dels diferents components del sistema de cromatografia líquida utilitzat.

Figure 2.2. Technical characteristics of the different components of the HPLC system used.

filtrats, els solvents es desgasificaven amb heli utilitzant un condicionador de solvents Pharmacia Biotech. La desgasificació amb He s'ha preferit a altres sistemes (sonicació, calor o buit) degut als seus avantatges: senzillesa d'aplicació, reproductibilitat del bombeig i línies de base més estables.

El programa d'anàlisi es va dissenyar especialment per obtenir l'acurada separació entre les diferents bacterioclorofil·les (*a*, *c*, *d* i *e*) i els seus homòlegs. La separació completa només es va aconseguir amb un programa de gradient. Aquest s'iniciava amb un increment lineal del solvent B del 50 al 100 % en 40 min seguit per una fase de manteniment del 100 % de B durant 18 min per facilitar l'elució dels compostos més apolars. En dos minuts es retornava a les condicions inicials (Figura 2.3). La durada total de l'anàlisi era de 60 min. Després de 10 min, necessaris per re-equilibrar la columna, el sistema estava preparat per a una nova injecció. Els millors resultats es van obtenir utilitzant un flux de 0,5 ml min⁻¹. Els cromatogrames es monitoritzaven a les longituds d'ona corresponents a un dels màxims d'absorció del pigment a analitzar (Taula 2.3).

Taula 2.3. Longituds d'ona escollides per la monitorització dels cromatogrames en l'anàlisi dels diferents pigments.

Table 2.3. Detection wavelength for the chromatographic monitoring of the different pigments analyzed.

Pigment	λ (nm)
Cl <i>a</i>	434
BCl <i>a</i>	770
BCl <i>c</i>	434
BCl <i>d</i>	427
BCl <i>e</i>	473
BCl <i>g</i>	750
Cbt	462
Isr	453
Okn	487

2.3.2.2. Tractament de les mostres

Després de l'anàlisi espectrofotomètrica, els extractes acetònics es centrifugaven a 4.500 rpm durant 15 min. El sobrenedants es filtraven amb filtres de xeringa Dynagard de 0,2 μ m de tamany de porus i es guardaven en vialets tipus *ependorf* preservats de la llum amb paper d'alumini. Abans de la injecció en el cromatògraf s'afegia a les mostres acetat d'amoni 1M a una concentració final del 10% com a parell iònic. La utilització de parells iònics incrementa la resolució en la separació de pigments molt polars o amb múltiples estats d'ionització (Mantoura i Lewellyn, 1983; Roy, 1987; Shioi, 1991). Les mostres es deixaven equilibrar durant 5 min i s'injectaven al sistema amb una xeringa Hamilton model 725R-80765 de 250 μ l de capacitat.

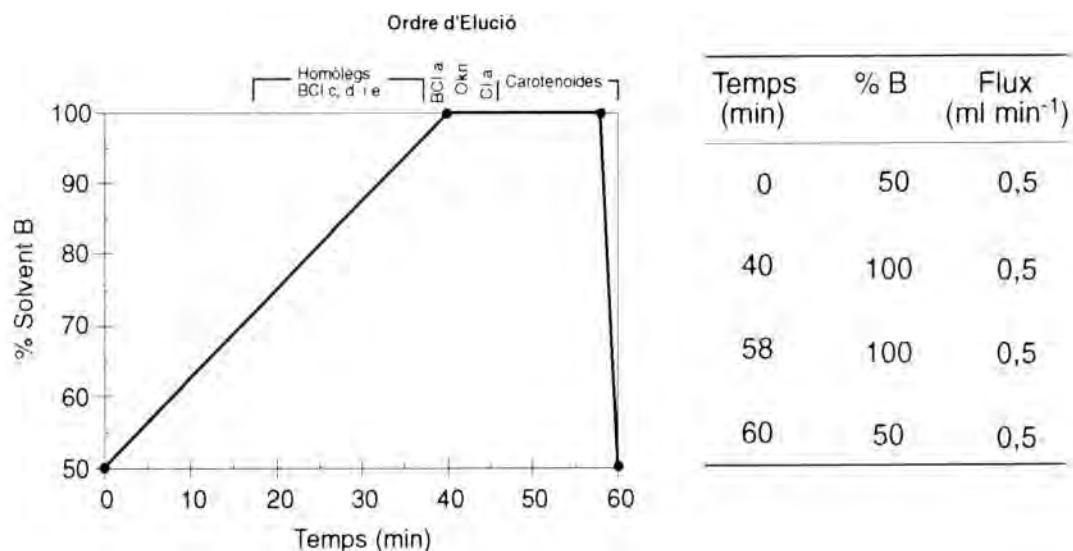


Figura 2.3. Programa de gradient de HPLC emprat i ordre d'elució dels diferents pigments.

Figure 2.3. HPLC solvent program used and elution order of the different photosynthetic pigment.

2.3.2.3. Anàlisi qualitativa

La identificació dels pigments eluïts durant la carrera cromatogràfica es va realitzar en base al seu espectre d'absorció, registrat automàticament entre 350 i 850 nm cada 30 s mitjançant el detector de fotodiodes. Posteriorment, els espectres obtinguts es comparaven amb els trobats a la bibliografia. L'enregistrament continuat del espectre d'absorció durant el temps de carrera permet la generació de contorns i gràfics tridimensionals on els eixos x, y i z corresponen a les variables temps, longitud d'ona i absorbància, respectivament. Aquest tipus de representació permet una visió molt més gràfica de l'heterogeneïtat pigmentària present en la mostra i de la seva separació (Figura 2.4).

2.3.2.4. Anàlisi quantitativa

Per la quantificació amb HPLC de les bacterioclorofil·les, els carotenoides bacterians i la Cl a es van elaborar patrons utilitzant dilucions seriades de diferents estàndards del pigment corresponent. Aquests estàndards es van obtenir mitjançant l'extracció del pigment de cultius bacterians purs. D'aquesta manera es va obtenir BCl a i Okn de *Chromatium minus*, BCl c i Cbt de *Chlorobium limicola*, BCl d de *C. vibrioforme f. thiosufatophilum* i BCl e i Isr de *C. phaeobacteroides*. L'estàndard de Cl a es va adquirir a Sigma Chemicals (Cl a d'*Anacystis nidulans*, lliure de Cl b, Ref: C6144).

Els extractes es quantificaven a l'espectrofotòmetre aplicant les fórmules descrites en l'apartat 2.3.1.2 i es preparaven per l'anàlisi cromatogràfica seguint les

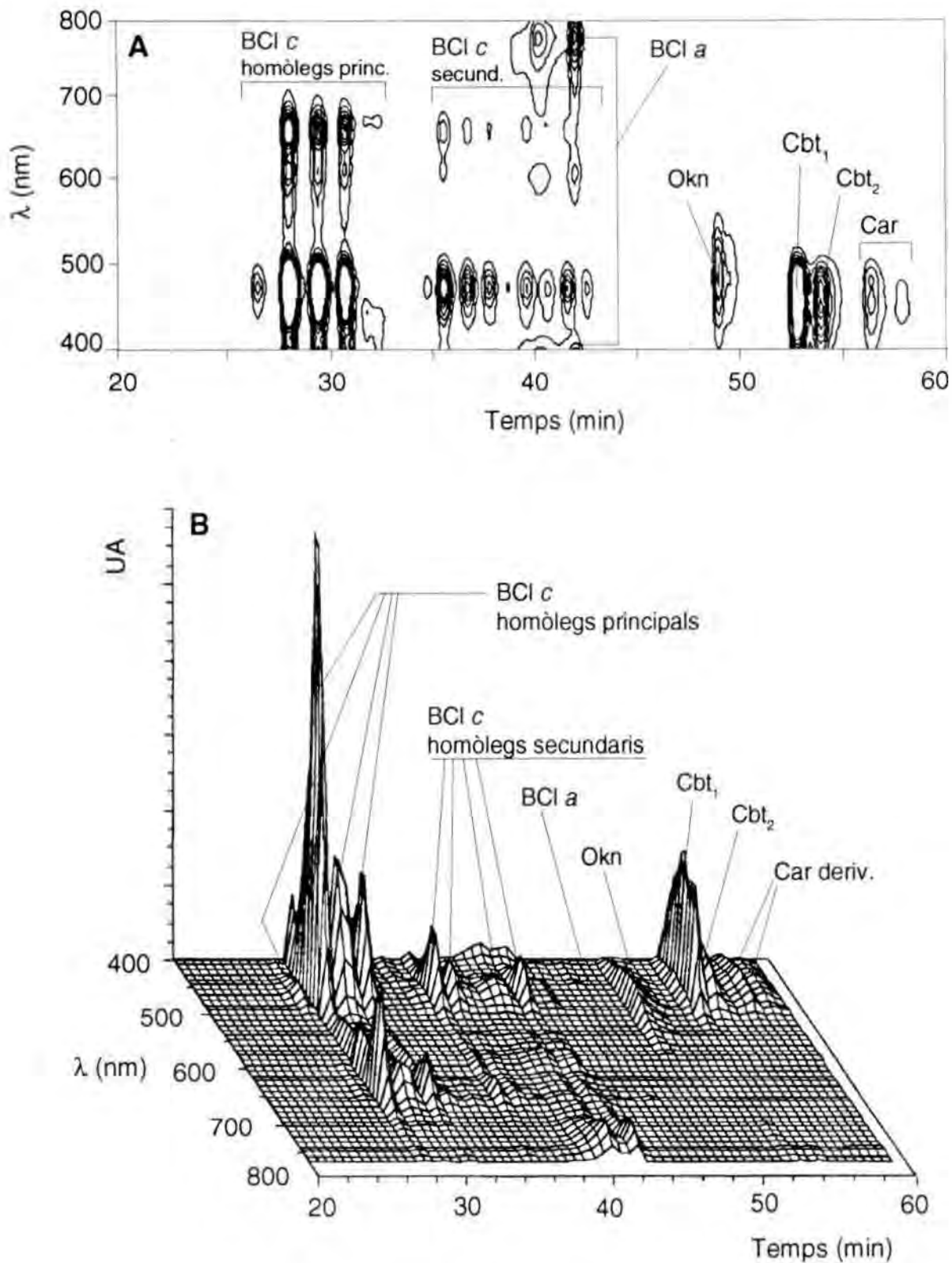


Figura 2.4. (A) Gràfic de contorns d'un extracte pigmentari generat pel programari *Millenium Chromatography Manager v. 2.0* on es mostren els diferents pigments separats. (B) Representació tridimensional del gràfic anterior. Les coordenades x , y i z corresponen a les variables temps, longitud d'ona i absorbància, respectivament.

Figure 2.4. (A) Contour plot of a pigment extract where the different eluted pigments are shown. (B) 3-D plot of the same sample. Spatial coordinates (x , y , and z) correspond to time, wavelength, and absorbance units, respectively.

especificacions esmentades anteriorment. Seguidament, 100 µl de l'extracte s'injectaven al cromatògraf per duplicat. Per a cada mostra s'integraven les àrees dels pics en els cromatogrames corresponents, atès que aquesta és proporcional a la concentració de pigment injectada. Per tal de obtenir la màxima sensibilitat en la detecció, els cromatogrames s'enregistraven a la longitud d'ona on el pigment a quantificar mostrava el valor màxim del coeficient d'extinció molar (Taula 2.3). Finalment, es representava la concentració injectada (en µg ml⁻¹) en front de l'àrea total en V*s i es calculava la recta patró. La resposta analítica del sistema fou òptima, tant pel grau de linealitat obtingut com per la sensibilitat a les baixes concentracions de pigment (Figura 2.5).

2.4. MÈTODES ANALÍTICS ESPECÍFICS

2.4.1. Determinació de la concentració de proteïnes

Per a la determinació de la concentració de proteïnes es va utilitzar el mètode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), basat en l'estimació de la proteïna present en una mostra en base al seu contingut en aminoàcids aromàtics. La reacció final és una combinació de reaccions; per una banda una reacció Biuret de les proteïnes amb el coure i, per l'altra, la reducció de l'àcid fosfomolibdic-fosfotúngstic del reactiu de Folin pels residus aromàtics tirosina i triptòfan de les proteïnes. El resultat és una reacció colorimètrica proporcional a la quantitat de proteïnes de la mostra.

Una vegada centrifugats els extractes pigmentaris, els sediments de centrifugació, lliures de pigments, es sotmetien a una digestió bàsica resuspenent-los mitjançant sonicació suau en un determinat volum de NaOH 1M. Posteriorment es col·locaven en un bany a 100°C durant 15 min. Una alíquota de la mostra digerida i refredada a temperatura ambient es posava en un tub de vidre i s'hi afegien 5 ml de Reactiu A (100 ml de Na₂CO₃ al 2% + 1 ml de CuSO₄ al 1% + 1 ml de tartrat de NaK al 2%). La mescla s'agitava amb ajuda d'un vortex i es deixava reposar durant 10 min. Passat aquest temps s'afegien 0,5 ml de Reactiu B (reactiu de Folin-Ciocalteu diluït 1:2) agitant simultàniament el tub amb el vortex. Les mostres problema es llegien a l'espectrofotòmetre (A₆₆₃) després de 30 min.

La concentració de proteïna es calculava a partir d'una recta patró realitzada a partir de dil·lucions seriades d'una sol·lució de 1 mg ml⁻¹ de BSA. La patró es preparava per a cada anàlisi.

2.4.2. Aïllament de fraccions sub-cel·lulars fotosintètiques

Per l'aïllament dels clorosomes i les membranes fotosintètiques s'utilitzava una modificació del mètode de Gerola i Olson (1986). Els cultius bacterians es retiraven a l'inici de la fase estacionària i es centrifugaven a 3.000 rpm durant 20 min en una centrífuga DAMON/IEC Division model PR IEC 6000. El sediment de centrifugació es rentava amb tampó Tris 50 mM a pH 8,0 i es tornava a centrifugar a 14.000 rpm durant 15 min en una centrífuga refrigerada d'alta velocitat SORVALL, model RC-

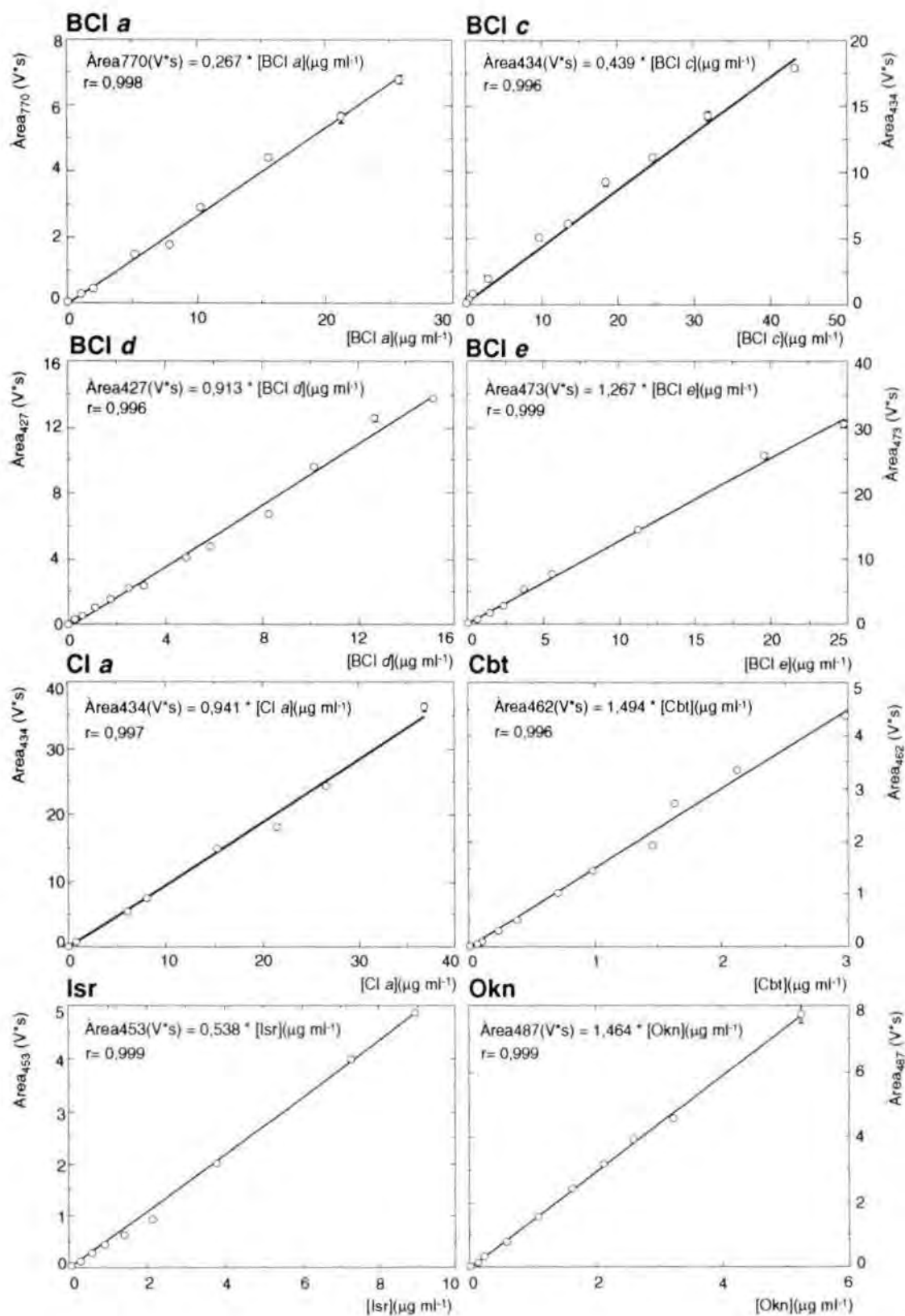


Figura 2.5. Rectes patrons pel càlcul de la concentració dels diferents pigments fotosintètics mitjançant HPLC. En tots els casos el volum d'injecció fou de 100 µl. Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 2.5. HPLC calibrations curves for the different photosynthetic pigments analyzed. The injection volume was 100 µl for all cases. Vertical bars: standard error.

5B. Es descartava el sobrenedant i els sediments de centrifugació que contenia les cèl·lules s'emmagatzemava a -80°C i sota atmosfera de N_2 fins el moment del seu processament.

Una vegada descongelats, els sediments de centrifugació es resuspenien amb un homogenitzador de vidre Potter-Elvehjem en 12 ml de tampó KPi 10 mM a pH 7,4 al qual s'hi afegia ascorbat sòdic a una concentració final de 10 mM per evitar la oxidació de la mostra. La mostra es col·locava en una cambra de pressió SLM-AMINCO model 20K prèviament refrigerada amb gel i es passava tres vegades per una premsa de French SLM-AMINCO operant a 20.000 psi. Per tal d'eliminar les cèl·lules senceres i les restes cel·lulars l'homogenitzat es tornava a centrifugar durant 15 min a 14.000 rpm. El sobrenedant resultant es carregava en gradients lineals de sacarosa (20 al 50%, pes/pes). Les solucions de sacarosa es preparaven en tampó KPi 10 mM a pH 7,4. Els gradients es centrifugaven en un rotor basculant de titani Beckman SW-40 durant aproximadament 18 h a 35.000 rpm en una ultracentrífuga Hitachi SCP 70H.

Una vegada centrifugats els gradients, les diferents fraccions cel·lulars apareixien com bandes colorejades distribuïdes en vertical en base a la seva densitat. Les bandes s'aïllaven descarregant els gradients amb una pipeta Pasteur i recollint-les en fraccions de volum conegut en tubs de vidre preservats de la llum. Les fraccions es col·locaven en diàlisi amb tampó KPi 10 mM a pH 7,4 per tal d'eliminar el contingut de sacarosa. Després de 4 canvis de tampó es recollien en tubs de vidre i s'en mesurava el volum de dilució. Finalment, les fraccions s'emmagatzemaven a -80°C fins el moment de l'anàlisi.

L'extracció dels pigments de les diferents fraccions es realitzava a les fosques mitjançant sonicació suau durant 2 min a 4°C en una mescla d'acetona-metanol (7:2 vol/vol). La resta de l'anàlisi i el càlcul de les concentracions de pigments es realitzava segons l'apartat 2.3.1.2. L'anàlisi cromatogràfica es va dur a terme en el sistema d'HPLC descrit per Juhler i Cox (1990) seguint les especificacions de l'apartat 2.3.2.

2.4.3. Fluorimetria

Els espectres d'emissió de fluorescència de les fraccions clorosòmiques i les fraccions enriquides en membranes fotosintètiques es van mesurar en un fluorímetre Spex Fluorolog acoplat a un ordinador personal per l'adquisició i tractament de les dades. Prèviament a l'anàlisi, les mostres es diluïen en tampó KPi 10 mM a pH 7,4 fins assolir una absorbància comparable en la zona del Q_y de la BCl. Les longituds d'ona per l'excitació es van seleccionar d'acord amb els màxims d'absorció en la banda Q_y de la BCl c de les mostres a analitzar. El pas de llum per l'excitació es va fixar en 9 nm i el d'emissió en 1,8 nm. La resolució espectral fou de 1 nm.

2.5.- MÈTODES DE CAMP

2.5.1.- Zona d'estudi

El treball de camp s'ha portat a terme bàsicament en dues cubetes meromíctiques de l'Estany de Banyoles i en l'estanyol Coromina localitzat a la vall de Sant Miquel de Campmajor. De forma puntual també s'han mostrejat altres ecosistemes aquàtics amb presència de bacteris fotosintètics del sofre.

2.5.1.1.- Estany de Banyoles

L'Estany de Banyoles es situa geogràficament a 2°45'40" Est i 42°07'45" Nord, llandant a l'est amb la ciutat de Banyoles i a 175 metres per sobre del nivell del mar. L'estany té una longitud màxima de 2 Km i una àrea de 1.117.800 m². L'estany té un origen càrstic i es troba constituït per una sèrie d'enfonsaments geològics (dolines) –anomenats *cubetes*– amb una morfologia pràcticament circular i que en alguns casos poden ser surgents. A l'estany es poden reconèixer fins a sis d'aquests enfonsaments; dos d'ells al lòbul sud (Cubetes I i II) i la resta al lòbul nord (Cubetes III, IV, V i VI) (Figura 2.6.A).

L'estudi s'ha centrat a les cubetes III i IV del lòbul nord de l'Estany de Banyoles, on s'ha portat a terme el seguiment de les poblacions de bacteris fotosintètics del sofre al llarg del seu creixement estacional. L'elecció d'aquestes cubetes es va fer atenent tant les seves característiques físico-químiques –meromixi, fondària de la interfase O₂-H₂S, etc– com al coneixement previ de la presència de poblacions estables i ben definides d'espècies de bacteris vermells i verds del sofre (Abella, 1980; Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992; Borrego *et al.*, 1993).

- Cubeta III

La cubeta III és, amb 25 m, la més profunda de les cinc cubetes que conformen el lòbul nord de l'estany. Té una forma circular i regular que denota el seu origen càrstic (Figura 2.6.B). La cubeta presenta una surgència d'aigua subterrània localitzada a 25 metres de fondària i en posició central, que manté en suspensió un material argilós anomenat *sediment en suspensió*. Aquest sediment ocupa un forat de 130 m de fondària (Abella, 1980). La fondària on comença aquest sediment en suspensió oscil·la al llarg de l'any depenent del flux d'entrada d'aigua subterrània (Roget i Casamitjana, 1987). L'aigua surgent conté una elevada concentració de sulfats (0,8 g l⁻¹) i és pobre en oxigen (2 mg l⁻¹), la qual cosa determina en bona part les característiques físico-químiques de l'aigua de la cubeta. L'entrada d'aigua més salada pel seu fons i l'elevada fondària de la cubeta –que evita la mescla total de la columna d'aigua durant l'hivern– permetent una estratificació química permanent.

- Cubeta IV

La cubeta IV (Figura 2.6.B) va ser la primera en ser dibuixada en un mapa batimètric (Vidal, 1908). La batimetria actual mostra un fons irregular on destaquen tres surgències –S4 (18 m), S11 (15 m) i S12 (19 m)– amb sediment en suspensió

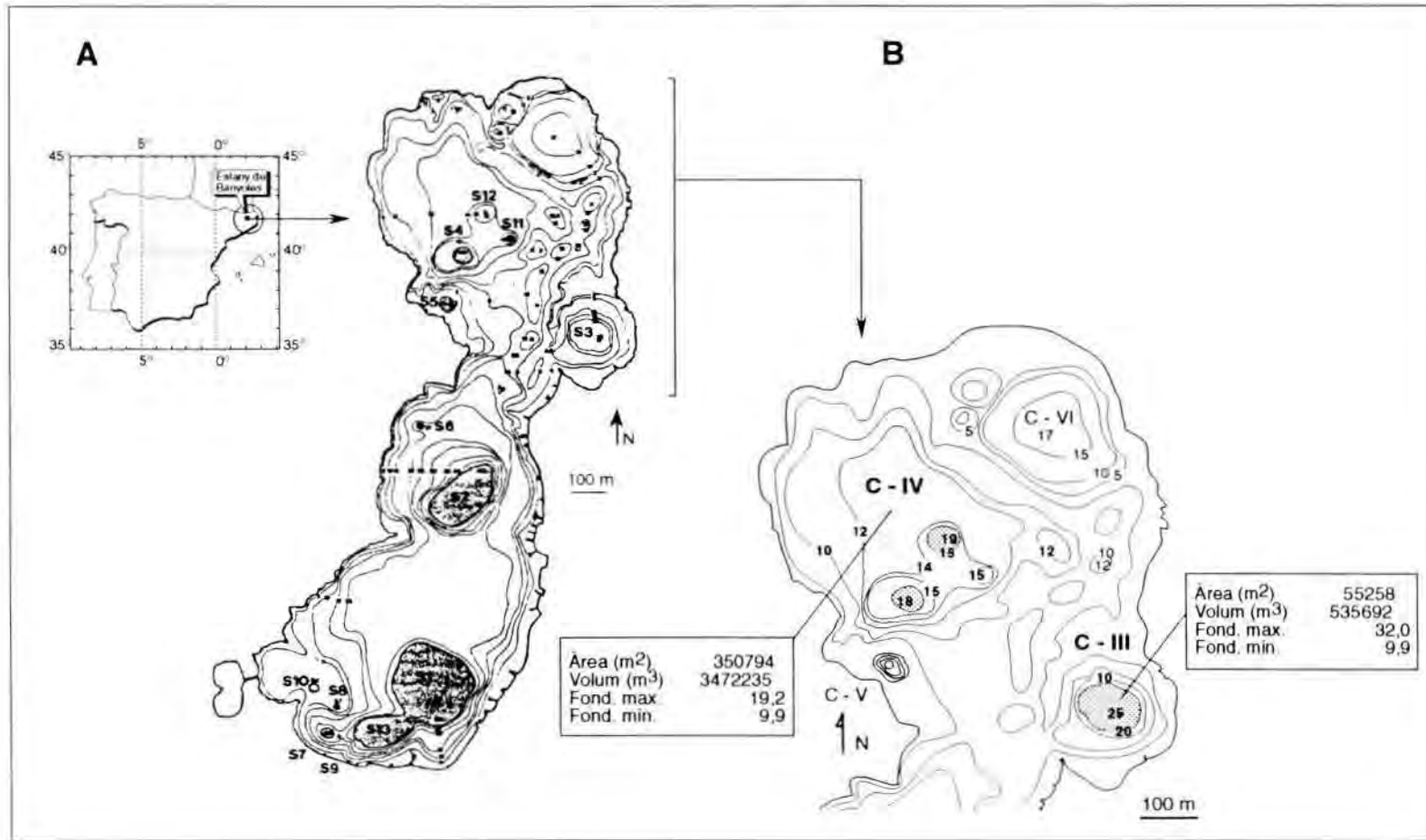


Figura 2.6. (A) Localització i mapa batimètric de l'estany de Banyoles on es representen les principals cubetes que el formen (Moreno-Amich & Garcia-Berthou, 1989). (B) Detall del lòbul nord de l'Estany on es mostren les cubetes estudiades (C-III i C-IV, àrees ombrejades) i els principals paràmetres morfomètrics de cadascuna (modificat de Garcia-Gil, 1990).

Figure 2.6. (A) Location and bathymetric map of Lake Banyoles (Moreno-Amich & Garcia-Berthou, 1989). (B) Bathymetric map of the northern lobe of the lake where the studied basins (C-III and C-IV) are shown (shaded areas) (After Garcia-Gil, 1990).

(Moreno-Amich i Garcia-Berthou, 1989). A C-IV, l'aigua surgent conté, a més de les característiques esmentades, entre 70 i 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de ferro en dissolució (Garcia-Gil, 1990). Tot i que C-IV es pot catalogar com a meromíctica, no es pot considerar del tot estable. Durant la mescla hivernal s'erosiona el monimolimnion, reduïnt-se el seu gruix de 5 a 1 m, tot i que no és freqüent la mescla total de la columna d'aigua (Garcia-Gil, 1990; Garcia-Gil *et al.*, 1993, 1996). Aquesta meromixi inestable és molt interessant des d'un punt de vista limnològic.

2.5.1.2. Estanyol Coromina

Aquest estanyol forma part d'un sistema lacustre d'origen càrstic localitzat a la vall de Sant Miquel de Campmajor, a 10 km de la ciutat de Banyoles. La Coromina és la llacuna més gran de la zona (64 m de diàmetre) i es troba en un enfonsament completament circular amb un pendent superior als 50° (Figura 2.7). A diferència de la majoria de llacs i llacunes de la zona de Banyoles, l'estanyol no rep un aport d'aigua subterrànea pel seu fons. Per aquest motiu el nivell d'aigua depèn exclusivament del balanç hídric entre el règim de precipitacions, l'evaporació i la utilització de les aigües pel regadiu, essent freqüents fortes variacions estacionals en la seva profunditat. La màxima fondària enregistrada durant el cicle estudiat va ser de 6 m i la mínima de 4,4 m. La profunditat màxima mitja de l'estanyol es va estimar en 5 m.

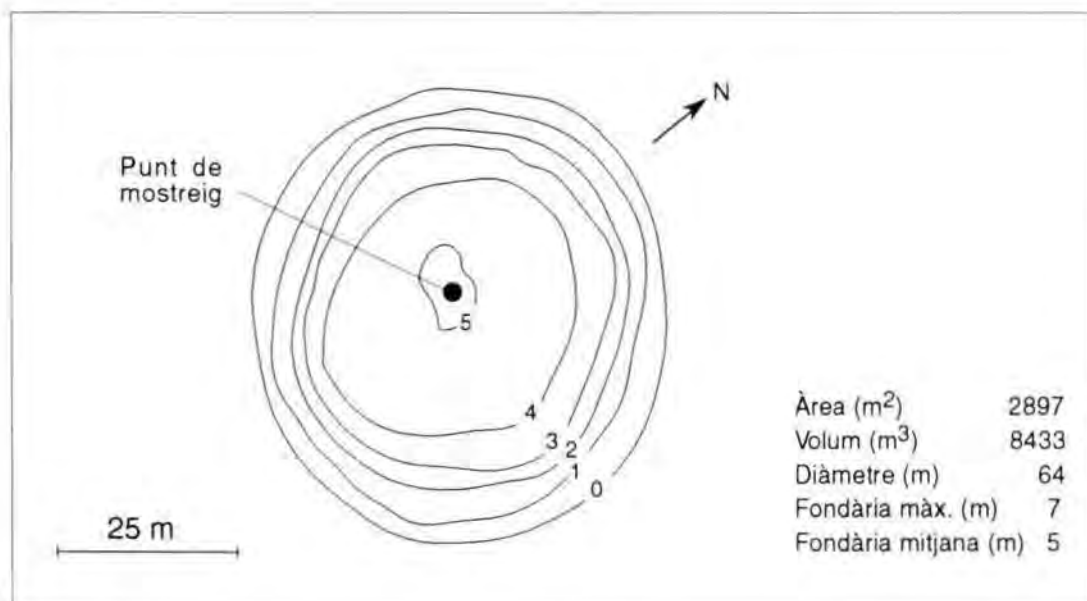


Figura 2.7. Mapa batimètric i alguns dels principals paràmetres morfològics de l'estanyol Coromina. Modificat de Abella (1980).

Figure 2.7. Bathymetric map and main morphometric parameters of the Coromina lagoon. Redrawn after Abella (1980).

Pel que fa a les seves característiques tròfiques, l'estanyol Coromina es considera hipereutròfic (Abella, 1980; Borrego i Garcia-Gil, 1994). Això és degut a l'elevada càrrega de nutrients de les seves aigües causada per l'abocament sistemàtic de residus agrícoles i ramaders. Com passa a l'estanyol d'en Sisó, la columna d'aigua del Coromina pot restar anaeròbica durant l'hivern degut a la protecció davant la mescla que li confereix l'elevat pendent de la cubeta d'enfonsament. La presència de bacteris fotosintètics del sofre –en particular d'espècies verdes vacuolades– en aquest estanyol ha estat recollida prèviament per Abella (1980); Abella i Garcia-Gil (1988) i Borrego i Garcia-Gil (1994).

2.5.1.3. *Altres*

Per tal d'estudiar l'eco-fisiologia pigmentària dels bacteris fotosintètics del sofre sota el major nombre de condicions de creixement possible, s'han realitzat estudis puntuals en diversos ecosistemes aquàtics, tant dins del sistema càrstic de Banyoles (Vilar i Sisó) com pertanyents a d'altres complexos lacustres com ara l'albufera de Mallorca, l'Europa central (Alemanya, Suïssa i Àustria) i la zona dels grans llacs dels Estats Units (estats de Michigan i Wisconsin).

- *Estanyol del Vilar*

El Vilar es troba situat al SW de l'eix longitudinal de l'Estany (42°7' latitud Nord, 2°45' longitud Est) i és un dels ecosistemes aquàtics més estudiats dins del sistema lacustre de Banyoles. L'estanyol presenta dues cubetes circulars –conegudes com Vilar-I i Vilar-II, de 10 m i 9 m, respectivament– amb entrada d'aigua subterrànea i sediment amb suspensió. L'estanyol ha estat considerat com a meromíctic eutròfic (Abella, 1980). Els treballs de recerca realitzats a l'estanyol s'han centrat bàsicament en l'estudi del seu caràcter tròfic (García de Emiliani, 1973; Brunet, 1990; Brunet *et al.*, 1990; Bañeras i Brunet, 1993) i en la dinàmica de les poblacions de bacteris fotosintètics del sofre que s'hi desenvolupen (Abella, 1980; Guerrero *et al.*, 1980; 1985; Bañeras, 1993).

- *Estanyol Sisó*

L'estanyol Sisó es troba localitzat a 200 m de la ribera oest de l'Estany de Banyoles, a 42°07'35" latitud Nord i 2°45'05" longitud Est. L'estanyol es troba format per una cubeta d'enfonsament en forma de conus invertit d'aproximadament 8 m de fondària i uns 27,5 m de diàmetre mitjà, amb una superfície de 487 m² (Garcia-Gil *et al.*, 1988). L'estanyol presenta entrada d'aigua subterrànea per una sorgència en el seu fons. El Sisó és un estanyol holomíctic, anaeròbic bona part de l'any i amb elevades concentracions de sulfhídric. Aquestes característiques fan que sigui corrent el desenvolupament de denses poblacions de bacteris fotosintètics del sofre en les seves aigües (Abella, 1980; Guerrero *et al.*, 1980; 1985; van Gemerden *et al.*, 1985; Pedrós-Alió *et al.*, 1986; Gasol, 1988).

- *Llacunes costaneres de Mallorca*

Es van estudiar dues llacunes costaneres del nord-est de l'illa de Mallorca, en concret la llacuna d'Es Cibollar i Es Gorg de Canyamel. Ambdues es troben molt properes a la costa i són meromíctiques degut a l'entrada d'aigua marina que es deposita en fondària (Moyà *et al.*, 1987; Martínez Taberner *et al.*, 1987).

- *Llacs centreeuropeus*

En total es van estudiar cinc llacs, dos localitzats a Alemanya (Buchensee i Schleinsee), dos a Austria (Höllernersee i Langsee) i un a Suïssa (Rotsee). Tots ells es troben en una franja geogràfica a l'entorn dels 47-48° de latitud N i entre els 8 i 15° de longitud E. Buchensee i Schleinsee són dos llacs holomíctics d'origen glacial del sud d'Alemanya on s'han descrit poblacions de bacteris fotosintètics (Abella i Garcia-Gil, 1988; 1992; Overmann i Tilzer, 1989; Eichler i Pfennig, 1990). Els llacs Höllernersee i Längsee es troben propers a la ciutat de Salzburg i en la regió de la Caríntia, respectivament. Són també llacs holomíctics i han estat objecte d'estudi limnològic continuat (Findenneg, 1935; Kusel-Fetzmann, 1973).

- *Llacs nord-americans*

Els llacs estudiats formen part de la zona dels grans llacs dels Estats Units, són d'origen glacial i presenten una estratificació suau (holomíctics) que es perd durant l'hivern. Els llacs estudiats han estat el Baker, Cassidy, Duck, Lefevre, Jones, Little Mill, Mud, Paul, Peter, Round, Warner i Wintergreen, tots ells localitzats a l'estat de Michigan i el Crystal, Fish, Mary, Minocqua, Mirror, Little Long, Little Silver, Silver, Sparckling, Trout Bog i Wood, localitzats a l'estat de Wisconsin. En la majoria d'aquests llacs es coneixia la presència de bacteris fotosintètics per treballs anteriors (Caldwell i Tiedje, 1975; Parkin i Brock, 1980a,b) o bé es sospitava la seva presència per les característiques físico-químiques de la columna d'aigua.

Tots els llacs i estanyols escollits tenien en comú una estratificació –tèrmica i/o química– més o menys consolidada. Les condicions d'anòxia i l'acumulació de sulfhídric en fondària eren també característiques comunes als estanyols estudiats. La diversitat entre ells venia donada tant per les diferències en la fondària on es trobaven els gradients físico-químics com per les espècies que conformaven la comunitat fotosintètica microbiana. La taula 2.4 recull la localització geogràfica dels llacs i estanyols mostrejats.

2.5.2.- Mostratge

El mostratge de les cubetes III i IV i de l'estanyol Coromina es va realitzar amb una periodicitat que oscil·lava entre els 15 i 20 dies, més o menys a la mateixa hora del dia, durant el període d'estratificació tèrmica estival. Aquest interval de temps es considerava com adequat atenent l'escala temporal en què tenen lloc els processos a estudiar.

La presa de mostres es portava a terme sempre sobre els punts de màxima fondària de les cubetes i estanyols, i es realitzava amb el sistema de bombeig descrit per Jørgensen i col·laboradors (1979). Aquest sistema consisteix en un doble conus de metacrilat unit a un tub de goma i connectat a una bomba impel·lent, que era alimentada per una bateria de 12 V (Figura 2.8). Aquest sistema assegura que l'extracció de l'aigua segueixi un flux laminar que és imprescindible a l'hora de prendre les mostres a la zona de gradient, on les poblacions microbianes es disposen en làmines molt denses i de pocs centímetres de gruix.

Taula 2.4. Localització geogràfica dels llacs i estanyols estudiats.*Table 2.4. Geographic location of the studied lakes.*

Llac	País	Latitud	Longitud
Banyoles	Girona	42°08' N	2°45' E
Coromina	"	42°07' N	2°40' E
Sisó	"	42°08' N	2°45' E
Vilar	"	42°07' N	2°45' E
Es Cibollar	Mallorca	39°50' N	3°10' E
Es Gorg de Canyamel	"	39°40' N	3°25' E
Buchensee	Alemanya	47°47' N	9°00' E
Schleinsee	"	47°36' N	9°38' E
Höllerersee	Austria	48°02' N	12°54' E
Längsee	"	46°47' N	14°25' E
Baker	Michigan	42°40' N	85°30' O
Cassidy	"	42°28' N	85°10' O
Jones	"	42°31' N	85°25' O
Lefevre	"	42°13' N	85°23' O
Little Mill	"	42°28' N	85°23' O
Mud	"	42°31' N	85°25' O
Round	"	42°40' N	85°30' O
Warner	"	42°28' N	85°32' O
Wintergreen	"	42°24' N	85°23' O
Paul	upper Michigan	46°15' N	89°30' O
Peter	"	46°15' N	89°30' O
Crystal	Wisconsin	43°48' N	88° 01' O
Fish	"	43°17' N	89°39' O
Little Long	"	44°38' N	88°56' O
Mary	"	46°15' N	89°54' O
Minocqua	"	45°51' N	89°43' O
Mirror	"	44°21' N	89°05' O
Silver	"	43°23' N	88°13' O
Silver Nord	"	43°23' N	88°13' O
Sparkling	"	46°01' N	89°42' O
Trout Bog	"	46°03' N	89°41' O
Wood	"	43°59' N	89°30' O

Les mostres d'aigua es recollien en ampolles de plàstic d'un litre de capacitat, hermèticament tancades i es transportaven al laboratori pel seu anàlisi. En el moment del mostreig es mesurava la temperatura, la conductivitat, l'oxigen dissolt i la penetració de la llum.

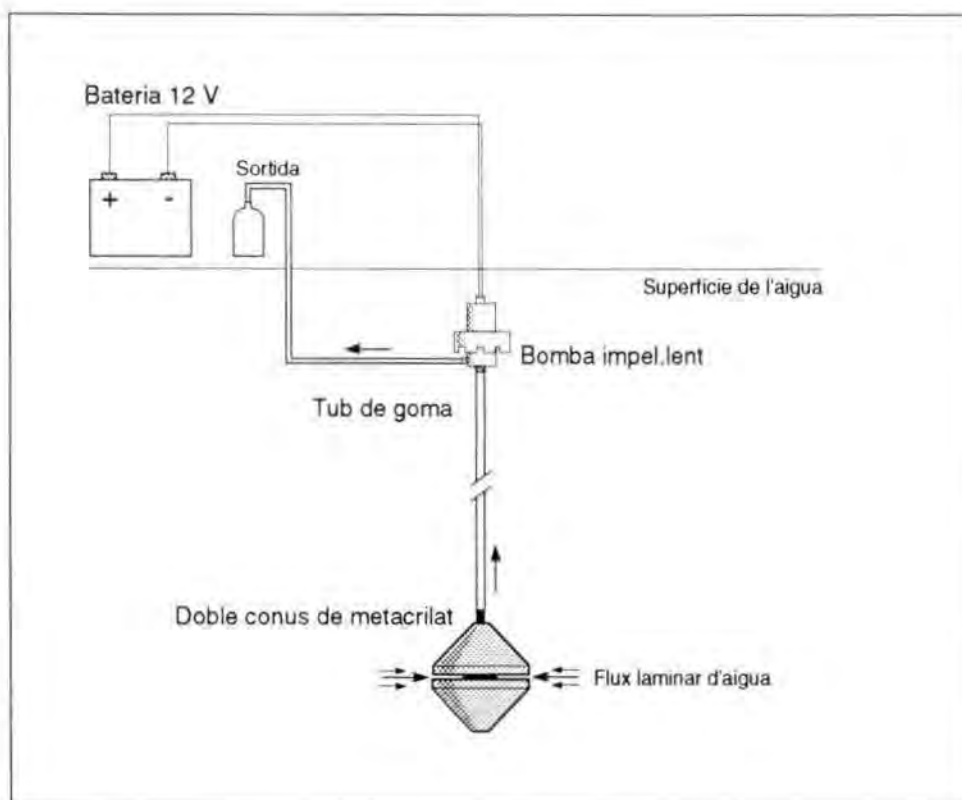


Figura 2.8. Sistema de doble conus utilitzat pel mostreig d'aigua de diferents fondàries.

Figure 2.8. Sampling device used to collect water samples from different depths.

2.5.3.- Paràmetres físics

2.5.3.1.- Temperatura i conductivitat

Tant la temperatura com la conductivitat de l'aigua es mesuraven *in situ* amb un conductímetre WTW (model LF-191). La conductivitat registrada era corregida automàticament per la temperatura a 20°C.

2.5.3.2.- Penetració de la llum

La penetració de la llum es va mesurar amb un quantòmetre de tipus esfèric Biospherical Instruments QSP-170 amb una esfera de teflon de 1,9 cm de diàmetre. Aquest aparell detecta la radiació fotosintèticament activa (P.A.R., acrònim del terme anglès *Photosynthetic Active Radiation*), compresa entre els 400 i 700 nm de longitud d'ona. Les lectures venen donades en $\mu\text{Einstein(E) m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Un Einstein correspon a un mol de fotons.

A banda del valor absolut de llum a cada fondària, aquesta ve donada també en alguns casos en percentatge respecte la llum incident a la superfície. Aquesta última es mesurava a uns 15 cm per sota la interfase aigua-aire per eliminar-ne les interferències (Vollenweider, 1974). A partir d'aquestes mesures es calculava el coeficient de extinció (η):

$$\eta = \frac{\ln I_1 - \ln I_2}{Z_2 - Z_1}$$

essent I_1 i I_2 les intensitats de llum en les fondàries Z_1 i Z_2 .

2.5.4. Paràmetres químics

Les anàlisis químiques es realitzaven al laboratori en un període de temps inferior a 24 hores. D'aquesta manera s'evitava l'alteració de les característiques de la mostra la qual contenia compostos reduïts, fàcilment transformables.

2.5.4.1. pH i potencial d'oxidorreducció (E_h)

El pH i el potencial Redox es mesuraven al laboratori amb un tester CRISON model 506 connectat a un elèctrode Ingold model U455-S7 i un elèctrode Crison model Pt 4805-S7, respectivament.

2.5.4.2. Oxigen dissolt

L'oxigen dissolt es mesurava *in situ* amb un oxímetre YSI model 57. Aquest està compost per un elèctrode connectat a un registrador mitjantçant un cable llarg que permet submergir-lo a la fondària desitjada per realitzar les lectures. El mètode de detecció es basa en la capacitat de l'oxigen de difondre a través d'una membrana. La difusió és proporcional a la pressió parcial de l'oxigen fora de la membrana.

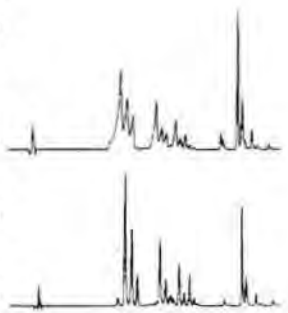
2.5.4.3. Sulfhídric

Per l'anàlisi de sulfhídric es seguia el mètode colorimètric del blau de leucometilè (Pachmayr, 1960) modificat segons Brock *et al.* (1971). Aquest mètode es basa en la capacitat del sulfur, sota condicions àcides, de reaccionar amb sulfat fèrric amònic i formar blau de leucometilè. Aquesta reacció és específica pel sulfhídric. Les mostres es fixaven al camp amb NaOH 1M i acetat de zinc 1M. Les concentracions de sulfhídric es calculaven a partir d'una recta patró realitzada amb concentracions conegudes de H_2S a partir de dilucions seriades d'una sol.lució 100 mmol l^{-1} de H_2S .

2.6.- TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES

El tractament estadístic de les dades s'ha realitzat amb el paquet estadístic SPSS^x (SPSS, 1988) en la seva versió per a Macintosh. Per l'anàlisi de components principals s'han emprat concretament els procediments Cluster i Factor Analysis.

**3. APLICACIÓ DE LA
TÈCNICA DE HPLC EN
L'ANÀLISI DE PIGMENTS
FOTOSINTÈTICS
BACTERIANS**



3.1. INTRODUCCIÓ

La primera referència a la presència d'un pigment clorofil·lic característic dels bacteris fotosintètics verds data de finals del segle passat (Ewart, 1897). En estudis posteriors, diferents autors designen aquests pigments amb noms diversos: bacteriolorina (Molish, 1907), bacterioviridina (Metzner, 1922) o clorofil·la de *Chlorobium* (Larsen, 1953). Stanier i Smith (1960), va diferenciar entre clorofil·la de *Chlorobium* 660 i 650 –fent referència a la localització del pic d'absorció en la regió del vermell– a l'analitzar extractes de diferents soques de *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*. Finalment, Jensen i col·laboradors van proposar el nom de Bacteriolorofil·la (BCl) *c* per la clorofil·la de *Chlorobium* 660 i BCl *d* per la clorofil·la de *Chlorobium* 650 (Jensen *et al.*, 1964). D'aquesta manera quedaven designades alfabèticament –*a*, *b*, *c* i *d*– les diferents bacteriolorofil·les conegudes fins aleshores. Posteriorment, Gloe i col·laboradors (1975) i Brockmann (1976) van aïllar i caracteritzar la BCl *e* a partir de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides*, mentre que Brockmann i Lipinski (1983) van descriure un nou tipus, la BCl *g*, en extractes d'*Heliobacterium chlorum*. L'existència d'una hipotètica BCl *f*, que diferís de la BCl *e* de forma similar a com ho fan la BCl *c* de la *d*, va ser proposada per Gloe i col·laboradors (Gloe *et al.*, 1975), tot i que aquesta nova BCl no s'ha aconseguit aïllar encara de cultius o poblacions naturals.

Les clorofil·les antena de *Chlorobium*, a més de la pròpia varibilitat entre espècies (BCl *c*, *d* i *e*), es troben formant una mescla d'homòlegs estructurals (Hughes i Holt, 1962, Gloe *et al.*, 1975; Brockmann, 1976; Scheer, 1991). Els diferents homòlegs solen estar esterificats amb farnesil i difereixen bàsicament en els substituents de l'anell tetrapirròlic –radicals C-8 i C-12– (Figura 3.1) (Goodwin, 1965; Scheer, 1991; Smith, 1994; Senge i Smith, 1995) i en la quiralitat del grup 3-(1-hidroxietil) (Risch i Brockmann, 1976; Smith *et al.*, 1983; Simpson i Smith, 1988). En alguns casos però, s'han identificat homòlegs esterificats amb diferents alcohols (Caple *et al.*, 1978).

En les Cloroflexàcies, la principal font de variabilitat és la naturalesa de l'alcohol esterificat ja que els radicals C-8 i C-12 no varien (ambdós grups metil). Aquest pot ser estearol, fitol, genanilgeraniol, hexadecanol, octadecanol i 9-octadecenol (Fages *et al.*, 1990). Fins i tot, Larsen i col·laboradors (1995) han demostrat la capacitat de *Chloroflexus* d'incorporar alcohols de cadena llarga d'una font exògena com a part constitutiva de les molècules de BCl. Això contrasta amb les primeres descripcions de la BCl *c* de *Chloroflexus aurantiacus*, caracteritzada com una forma molecular única (BCl *c*₁) esterificada amb estearil (Gloe i Risch, 1978; Pierson i Castenholz, 1974a, b; Risch *et al.*, 1979).

La primera resolució de les diferents estructures moleculars per cadascun dels homòlegs de BCl *c* va ser realitzada per Holt i col·laboradors a la dècada dels seixanta (Holt i Hughes, 1961; Holt *et al.*, 1962; 1966; Hughes i Holt, 1962; Purdie i Holt, 1965). Després d'una certa controvèrsia sobre les assignacions estructurals d'aquest pigment (Kenner *et al.*, 1976; 1978; Smith *et al.*, 1980), Smith i col·laboradors (1983) van caracteritzar les estructures definitives. Les estructures moleculars de

les BCl *d* i *e* van ser descrites per Smith i Goff (1985) i Brockmann (1976), respectivament. Finalment, Smith (1994) va proposar un sistema simple de nomenclatura pels diferents homòlegs coneguts.

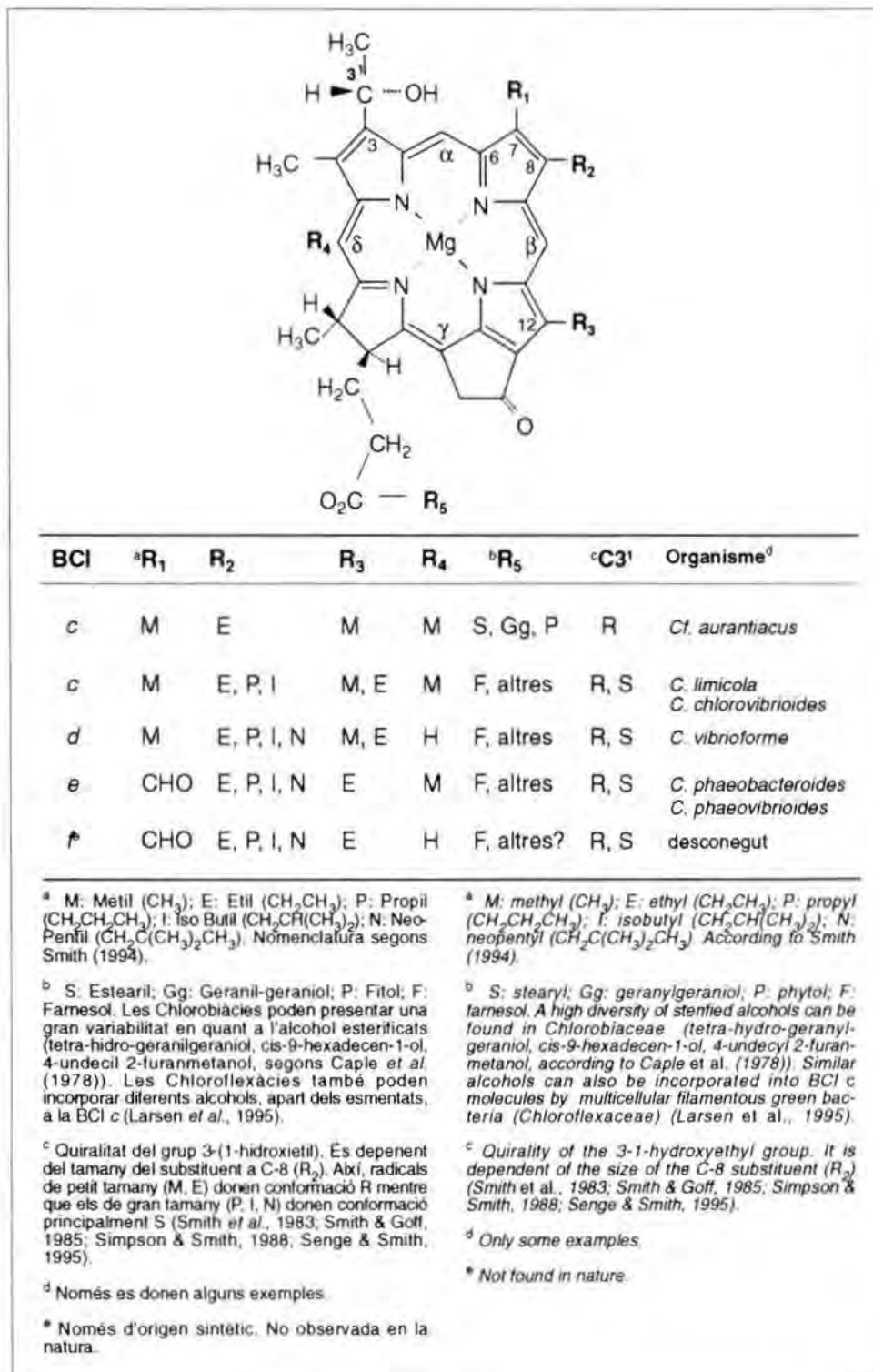


Figura 3.1. Estructures dels principals homòlegs de les BCl *c*, *d* i *e*. Adaptat de Scheer (1991), Smith (1994) i Senge & Smith (1995).

Figure 3.1. Chemical structures of the main BCl *c*, *d* and *e* homologs. Adapted from Scheer (1991), Smith (1994) and Senge & Smith (1995).

Aquesta diversitat pigmentària present a l'antena fotosintètica dels bacteris verds del sofre fa gairebé impossible una acurada determinació de cada un dels diferents pigments mitjançant tècniques convencionals com ara l'espectrofotometria doncs, a més de l'elevat nombre de pigments, els diferents homòlegs de cada BCl presenten un mateix espectre d'absorció en solvents orgànics (Otte *et al.*, 1993). En els darrers anys s'han desenvolupat diversos mètodes de HPLC que eviten problemes en la separació i identificació dels pigments bacterians (Bidigare *et al.*, 1985; Korthals i Steenbergen, 1985; Yacobi *et al.*, 1990; Hurley and Watras, 1991) tot i que resulten ineficaços alhora d'aconseguir una separació completa dels diferents homòlegs. El principal inconvenient es troba en la dificultat que suposa el separar components de polaritats similars –els diferents homòlegs– que solen eluir en forma de diversos pics solapats de difícil discriminació (Korthals i Steenberger, 1985; Yacobi *et al.*, 1991).

L'objectiu del treball que es presenta en aquest capítol fou el de dissenyar un mètode de HPLC per aconseguir la separació completa de les principals clorofil·les bacterianes i els seus corresponents homòlegs. El mètode desenvolupat es va revelar com extremadament eficaç, tant en la separació de les bacterioclorofil·les (BCls) i els seus homòlegs com en la separació d'altres tipus de pigments fotosintètics com ara la Cl *a*, les feofitines i els diferents carotenoides algals i bacterians. El mètode cromatogràfic es va aplicar també en l'anàlisi dels pigments d'altres bacteris fotosintètics, com ara els bacteris vermells del sofre (Cromatiàcies), bacteris verds filamentosos (Cloroflexàcies) i heliobacteris (Heliobacteria). Cada grup bacterià va donar lloc a un patró d'elució diferenciat i característic. Comprovada l'eficàcia del mètode, un segon objectiu fou el de realitzar un estudi sobre la composició pigmentària de les diferents espècies estudiades per intentar esbrinar si la composició i distribució dels homòlegs tenia valor taxonòmic o bé era un reflex de l'estat fisiològic cel·lular.

3.2. RESULTATS

3.2.1. Separació i identificació dels pigments fotosintètics

La separació completa dels diferents homòlegs només es va aconseguir afegint un parell iònic a la mostra. Sense aquest, els diversos homòlegs es van eluir en una banda ampla de pics solapats (Figura 3.2.A). Els múltiples estats d'ionització en que es solen trobar les molècules de pigment provoca l'elució continuada d'aquestes quan les condicions de la fase mòbil són les idònies. L'elució solapada dels diferents homòlegs impedia obtenir una bona resolució i, per tant, feia difícil la seva quantificació acurada. Amb l'addició del parell iònic en canvi, es fixen les condicions d'ionització en la mostra i l'elució dels diversos homòlegs durant la carrera es fa únicament en base a les seves diferències estructurals. Això dona com a resultat l'elució dels diferents pigments en forma de pics estrets i completament separats (Figura 3.2.B). D'altra banda, l'addició del parell iònic no va tenir cap efecte significatiu sobre els temps de retenció dels diferents pigments, fet que ja havia

estat remarcat per altres autors (Mantoura i Lewellyn, 1983). Els avantatges de la utilització de parells iònics d'aquest tipus en la separació de pigments fotosintètics han estat destacades per Roy (1987) i Yacobi *et al.* (1990).

Els extractes pigmentaris de les diferents bacterioclòrfiles (BCI *a*, *c*, *d*, *e* i *g*) es van obtenir a partir de cultius purs de soques de laboratori de les corresponents espècies de bacteris fotosintètics (veure Capítol 2, taula 2.1).

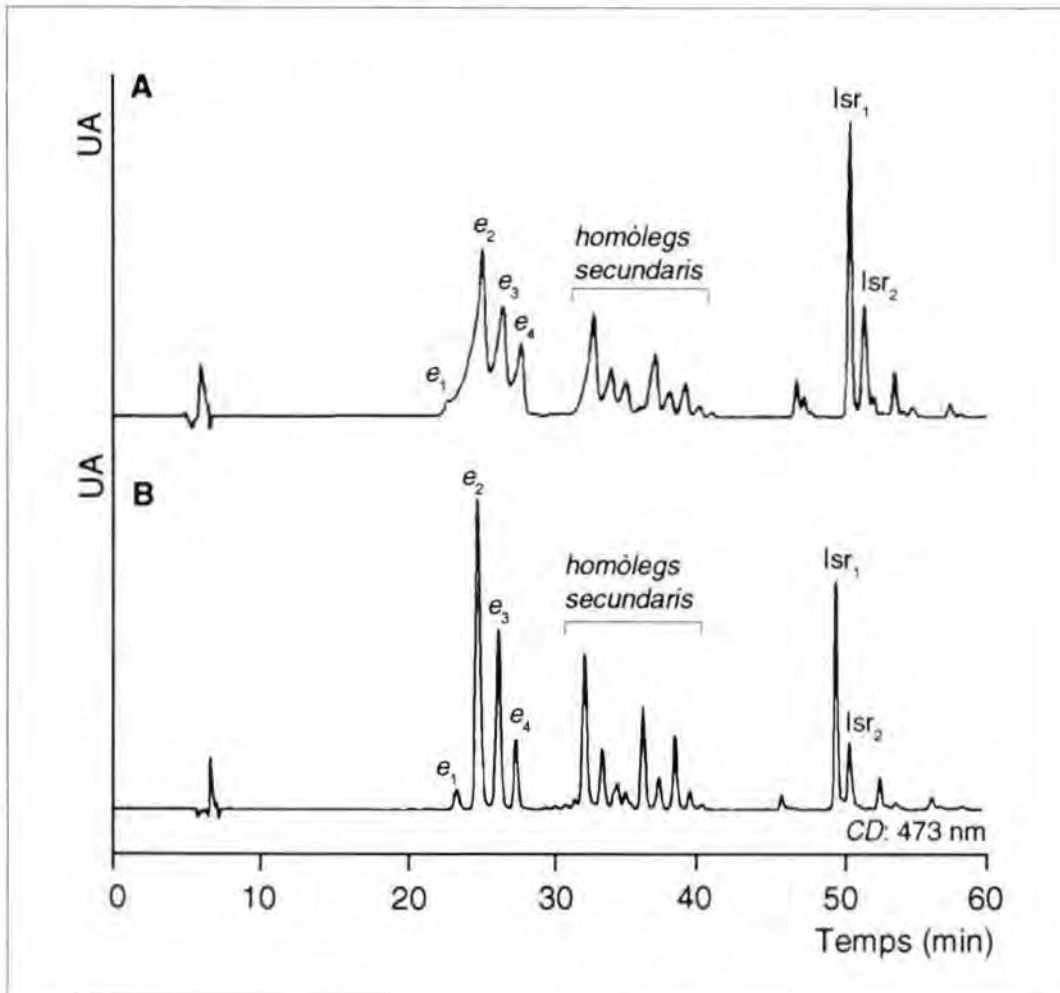


Figura 3.2. Comparació entre els cromatogrames de (A) un extracte pigmentari de *Chlorobium phaeobacteroides*, sense parell iònic i (B) amb l'addició del 10% d'aquest (acetat d'amoni 1M).

Figure 3.2. Comparison between HPLC traces of (A) *Chlorobium phaeobacteroides* pigment extracts without and (B) same as A but with the addition of an ion pairing agent (10% of 1M ammonium acetate).

3.2.1.1. Bacteris verds del sofre

L'anàlisi amb HPLC dels extractes pigmentaris dels bacteris verds del sofre va donar lloc a cromatogrames amb un nombre variable de pics que corresponien tant a les diferents formes homòlogues de les BCls com als carotenoides presents en cada espècie (Figura 3.3). Per a nombrar cadascun dels homòlegs es va utilitzar la nomenclatura adient per a cada tipus de bacterioclòrfile (segons Smith, 1994) i

un sub-índex numèric en base a l'ordre creixent d'elució (per exemple, el segon homòleg eluït de la BCl *c* seria el BCl *c*₂, el tercer el BCl *c*₃, etc). Tot i que els homòlegs de les diferents BCl van eluir molt propers els uns amb els altres no es va observar un solapament crític en els seus temps de retenció (Taula 3.1). Els pics més propers van eluir entre els minuts 26 i 29 (identificats com BCl *d*₄, BCl *c*₃ i BCl *c*₄) i entre els 37 i 39 (en aquest cas, la BCl *a*).

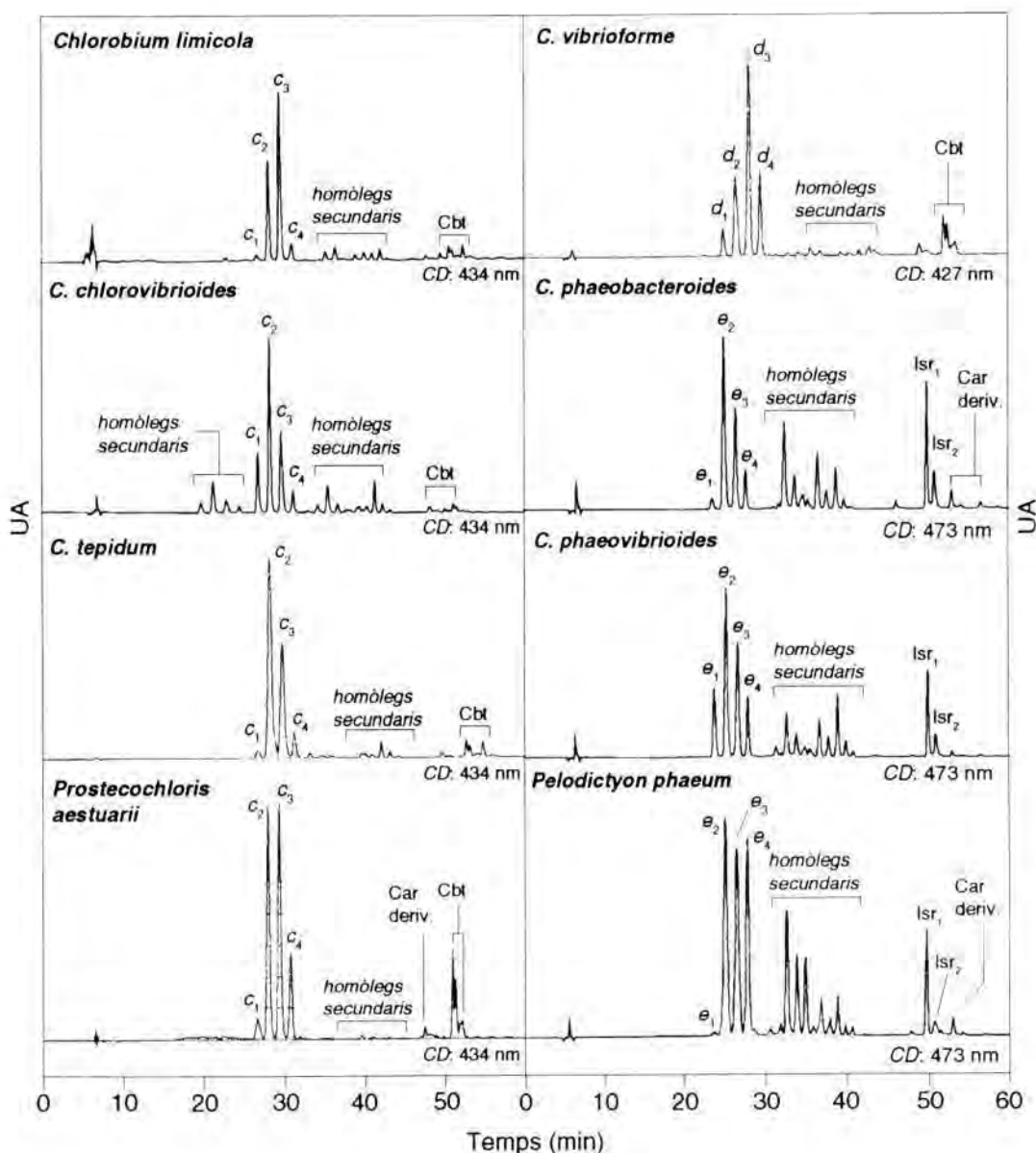


Figura 3.3. Cromatogrames dels extractes pigmentaris d'algunes de les espècies estudiades on es mostren els principals pigments identificats.

Figure 3.3. Chromatograms of different bacterial extracts analyzed where the main photosynthetic pigments are shown.

Taula 3.1. Temps de retenció i màxims d'absorció en l'HPLC dels diferents pigments fotosintètics analitzats. F: farnesol, P: fitol, (?): no identificat.

Table 3.1. Retention times and main absorption maxima of the different photosynthetic pigments analyzed. F: farnesol, P: phytol, (?): not identified

Pigment	Temps de Retenció (min)	λ max. (nm)	Espècie
BCl _F e ₁	23,60 ± 0,15	473–654	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>
BCl _F e ₂	24,89 ± 0,12	473–654	<i>C. phaeobacteroides</i>
BCl _F d ₁	25,06 ± 0,10	408–427–656	<i>C. vibrioforme</i> f. <i>thiosulf.</i>
BCl _F g ox.	26,02 ± 0,10	437–665	<i>Heliobacillus mobilis</i>
BCl _F e ₃	26,28 ± 0,12	473–654	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>
BCl _F d ₂	26,48 ± 0,10	408–427–656	<i>C. vibrioforme</i> f. <i>thiosulf.</i>
BCl _F c ₁	26,61 ± 0,14	434–668	<i>C. limicola</i>
BCl _F e ₄	27,53 ± 0,12	473–654	<i>C. phaeobacteroides</i>
BCl _F d ₃	28,04 ± 0,10	408–427–656	<i>C. vibrioforme</i> f. <i>thiosulf.</i>
BCl _F c ₂	28,37 ± 0,09	434–668	<i>C. limicola</i>
BCl _F d ₄	29,46 ± 0,10	408–427–656	<i>C. vibrioforme</i> f. <i>thiosulf.</i>
BCl _F c ₃	29,77 ± 0,10	434–668	<i>C. limicola</i>
BCl _F c ₄	30,96 ± 0,13	434–668	<i>C. limicola</i>
BCl _F g	31,46 ± 0,10	408–592–754	<i>Heliobacillus mobilis</i>
BCl _F c ₁	34,21 ± 0,12	434–668	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
Rpl	37,35 ± 0,62	511	<i>Chromatium buderii</i>
BCl _P a	38,61 ± 0,14	365–604–770	Cromatiàcies
BCl _F c ₂	39,11 ± 0,10	434–668	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
BCl _F c ₃	41,11 ± 0,16	434–668	<i>C. aurantiacus</i>
Okn	42,54 ± 0,09	462–487–516	<i>Chromatium minus</i>
BCl _F c ₄	42,94 ± 0,08	434–668	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
Rdp	43,93 ± 0,36	445–472–506	<i>Chromatium buderii</i>
Cl a	45,14 ± 0,27	434–663	Algues i Cianobacteris
Esp	45,67 ± 1,56	468–497–531	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>
Isr ₁	49,44 ± 0,14	430–453–487	<i>Chlorobium. phaeobacteroides</i>
Nrp	47,36 ± 0,10	415–441–470	<i>Heliobacillus. mobilis</i>
Isr ₂	50,45 ± 0,19	430–453–487	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>
Cbt ₁	51,02 ± 0,19	436–462–493	<i>C. limicola</i>
Cbt ₂	51,95 ± 0,09	436–462–493	<i>C. limicola</i>
Lcp	52,80 ± 0,01	448–472–502	<i>Chromatium vinosum</i>

Totes les soques de bacteris verds del sofre estudiades van presentar un patró d'elució característic per les seves BCl, amb els corresponents homòlegs agrupats en dos conjunts de pics. El primer conjunt, amb temps de retenció (T_r) compresos entre 24 i 30 min, estava constituït per quatre pics majoritaris i és on s'el·luïa la major part del pigment. El segon grup, eluït entre els minuts 33 i 40, estava format per un nombre variable de pics minoritaris. *Chlorobium chlorovibrioides* va mostrar un patró diferent a la resta d'espècies analitzades, doncs el conjunt d'homòlegs secundaris es trobava subdividit en dos: un grup que el·luïa abans (minuts 19 a 23) i l'altra després (minuts 33 a 40) del conjunt de quatre homòlegs principals. Un fet a remarcar és que tots els homòlegs de cada BCl van presentar un espectre d'absorció idèntic i que era característic del tipus de BCl analitzada (Figura 3.4).

Pel que fa la separació dels carotenoides bacterians, la resolució obtinguda en la separació d'aquests pigments fou inferior a l'obtinguda per les BCl degut a les característiques de polaritat pròpies del gradient d'elució emprat. Els carotenoides bacterians –clorobactè i isorenieratè– van eluir a temps de retenció similars i en forma de dos pics cadascun. Aquest fenomen podria obeir a la presència de formes derivades (isòmers o formes oxidades) d'aquests pigments. L'Isr va eluir a temps de retenció inferiors (min 49–50) que el Cbt (min 51–52).

3.2.1.2. Bacteris filamentosos multicel·lulars (Cloroflexàcies)

Els pigments de *Chloroflexus aurantiacus* van mostrar un patró d'elució característic, diferent dels obtinguts pels bacteris verds del sofre tot i que ambdós grups presenten BCl *c* com a pigment antena comú. La BCl *c* de *Chloroflexus aurantiacus* pot estar esterificada amb una gran varietat d'alcohols (Gloe i Risch, 1978; Larsen *et al.*, 1995) i, per tant, difereix molt de la descrita en bacteris verds del sofre. Els principals carotenoides d'aquesta espècie són el β i el γ -carotè.

L'anàlisi cromatogràfica va mostrar fins a quatre pics majoritaris de BCl *c* (Figura 3.5), tots ells amb temps de retenció més elevats que els corresponents als homòlegs de la BCl *c* dels bacteris verds del sofre (Taula 3.1). Un altra tret significatiu de l'anàlisi de l'extracte de *Chloroflexus* fou la presència, en petites quantitats, de BCl *d* que es va eluir en forma de pics molt petits just al davant dels pics majoritaris de BCl *C*.

3.2.1.3. Cromatiàcies

L'anàlisi cromatogràfica dels extractes de diverses espècies dels bacteris vermells del sofre va resultar menys diversa que la obtinguda amb els bacteris verds. En tots els casos, la BCl *a* va eluir en forma d'un únic pic a un T_r de $38,6 \pm 0,14$ min (Figura 3.6.A). Ocasionalment, es van detectar pics minoritaris immediatament anteriors o posteriors al pic principal de la BCl *a* que es van associar a formes derivades, probablement degradatives, de la pròpia BCl *a*. La contribució d'aquestes formes en el total de pigment mai es va considerar significativa ja que el seu valor va ser sempre inferior al 0,5 % del total de BCl *a*.

A) Espècies verdes

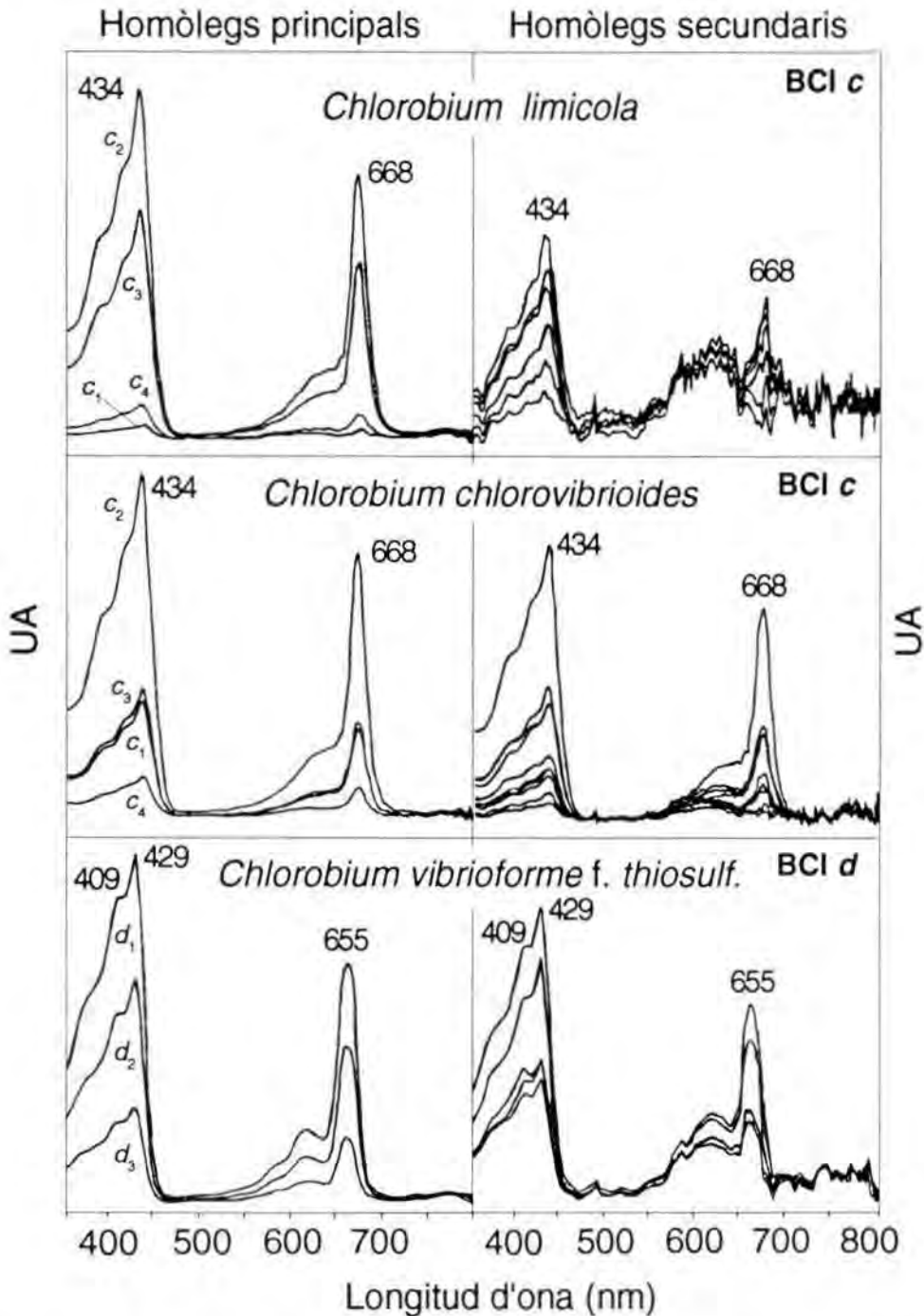


Figura 3.4. Espectre d'absorció dels quatre homòlegs principals (esquerra) i dels homòlegs secundaris (dreta) de les diferents bacteriochlorofil·les. Els espectres d'absorció distorsionats corresponents als homòlegs secundaris són causats per la baixa concentració de pigment en el detector.

Figure 3.4. Absorption spectra of the main homologue set (left panel) and secondary one (right panel) from different bacteriochlorophylls. The distorted spectra from secondary homologues are due to the extremely low concentration at the detector cell.

B) Espècies marrons

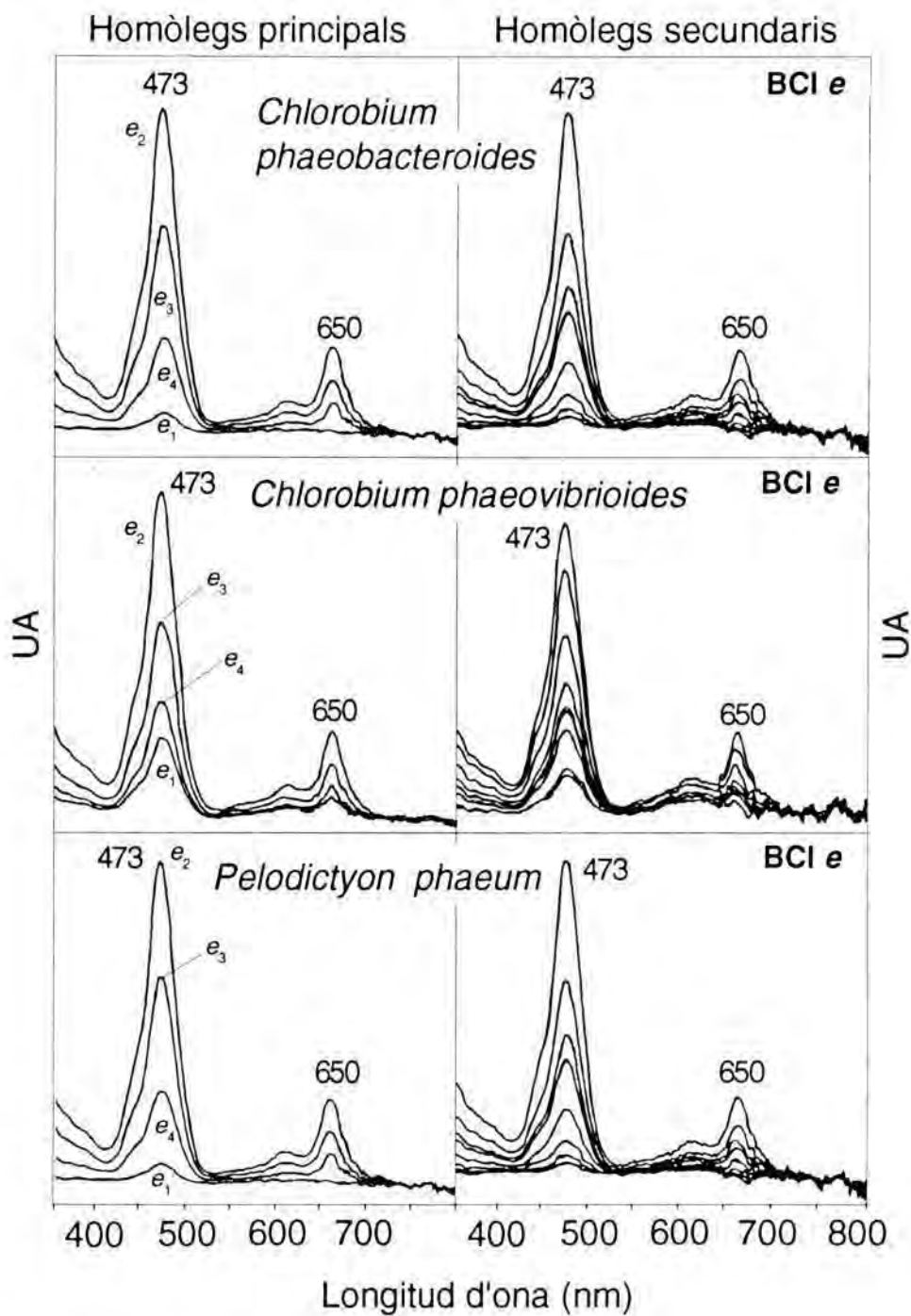


Figura 3.4. Continuació.

Figure 3.4. Continued.

En Cromatiàcies la principal heterogeneïtat va venir donada per la presència de diversos carotenoides –okenona, espiril.loxantina, rodopinal, rodopina i licopè–, eluïnt en un o varis pics depenent del tipus de carotenoide i de l'espècie analitzada. L'Okn va eluir a un T_r de $42,5 \pm 0,09$ min (Figura 3.6.B); l'Esp a $45,7 \pm 1,5$ min; el Rpl a $37,35 \pm 0,62$ min; la Rpn a $43,93 \pm 0,36$ min i el Lcp a $52,8 \pm 0,01$ min.

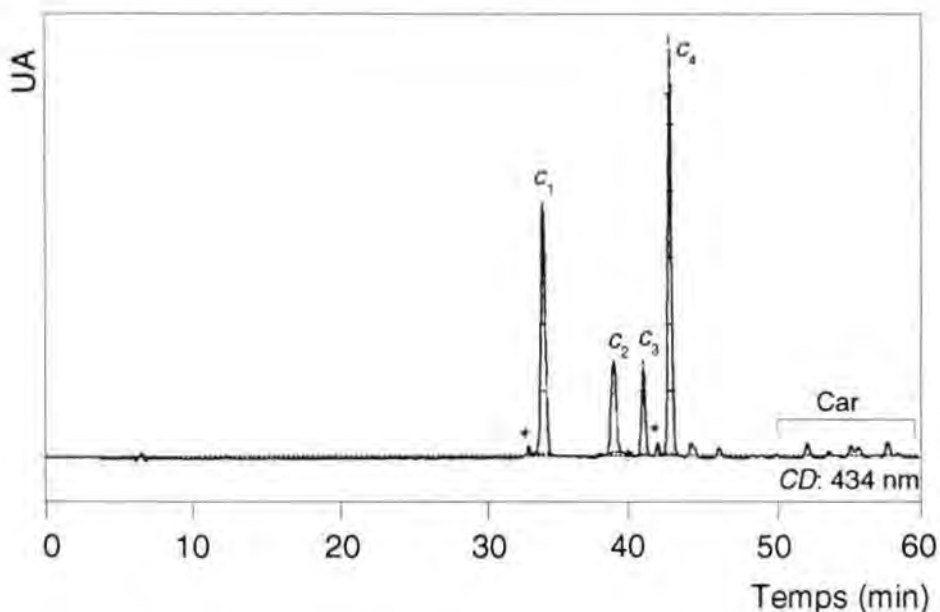


Figura 3.5. Cromatograma de l'extracte pigmentari de *Chloroflexus aurantiacus* on es mostren els principals pigments identificats. *: Formes de BChl d, possiblement precursors en la síntesi de BChl c (Brune *et al.* 1987a; Larsen, 1994).

Figure 3.5. Chromatogram of the *Chloroflexus aurantiacus* pigment extract where the main photosynthetic pigments are shown. *: BChl d forms, presumably associated to precursors in BChl c synthesis (Brune *et al.* 1987a; Larsen, 1994).

3.2.1.4. *Heliobacteris*

Els *Heliobacteris* són un grup de bacteris fotosintètics caracteritzat per la seva simplicitat estructural i funcional i per la presència de BCl g, un tipus de bacterio-clorofil. la emparentada estructuralment i evolutiva amb la Cl a (Gest i Favinger, 1983; Brockmann and Lipinski, 1983; Michalski *et al.*, 1987). Per tal de comprovar la utilitat del mètode cromatogràfic desenvolupat en l'anàlisi d'aquesta BCl, es van injectar extractes pigmentaris de *Heliobacillus mobilis* (Figura 3.7.A). Els cromatogrames van mostrar una perfecta separació de la BCl g (T_r de 31,46 min) respecte la resta de clorofil. les antena analitzades anteriorment (que eluïen entre els 23 i 30 min). Es pot observar un pic majoritari de BCl g, i dos pics minoritaris, l'un immediatament posterior (T_r de 32,6 min) i l'altre més allunyat (T_r de 45,9 min), identificats també com BCl g en base al seu espectre d'absorció (màxims a 400, 592 i 753 nm) (Figura 3.7.B). Ambdós pics es van atribuir a derivats de la BCl g principal. La separació del neurosporè, el carotenoide majoritari de l'espècie analitzada, també va ésser prou bona tenint en compte la diferència entre el seu temps de retenció (T_r de 47,4 min) i els de la resta de carotenoides bacterians.

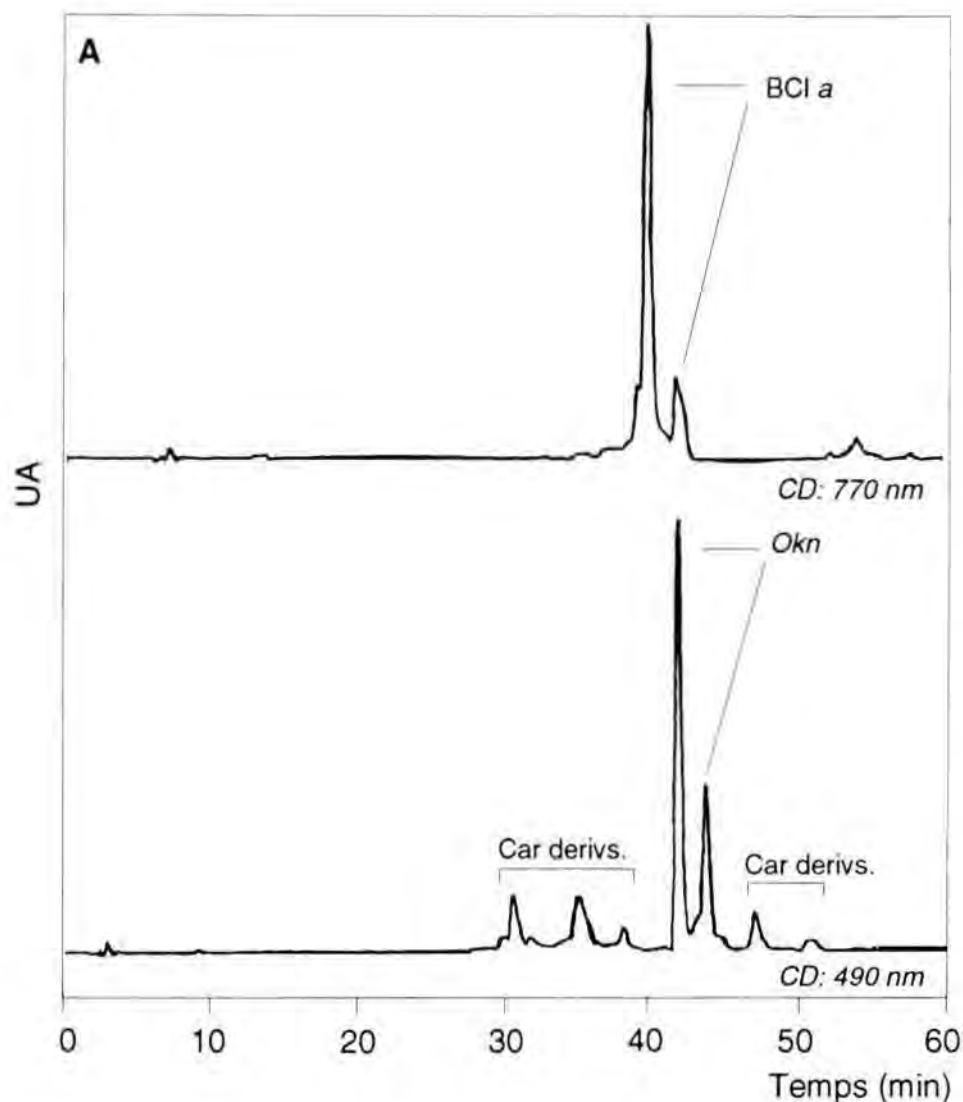


Figura 3.6. Cromatogrames dels l'extracte pigmentaris de *Chromatium minus* enregistrats a (A) 770 nm i (B) 487 nm on es mostren els pics corresponents a la BChl a i l'Okn, respectivament. Els pics minoritaris es van atribuir a formes derivades de carotenoides.

Figure 3.6. Chromatograms of the pigment extract of *Chromatium minus* recorded at (A) 770 nm and (B) 487 nm where the peaks corresponding to BChl a and Okn are shown. Small peaks were attributed to carotenoid derivatives.

Una de les característiques més destacades de l'anàlisi cromatogràfica dels pigments fotosintètics d'*Heliobacillus mobilis* fou la presència d'un pigment clorofil·lic (T_r de 26,02 min) que presentava màxims d'absorció a 437 i 665 nm. En base a les característiques espectrals esmentades i al temps de retenció, aquest pigment es va identificar com una forma de BChl c. La BChl g dels Heliobacteris és extremadament sensible a l'oxigen (Beer-Romero *et al.*, 1988). En condicions d'il·luminació i baixes

tensions d'oxigen provoca la desaparició dels pics característics de la BCl *g* –575 i 788 nm *in vivo*– i l'aparició concomitant d'un pic a 670 nm. Aquest canvi en l'espectre d'absorció ha estat interpretat com una fotoisomerització de la BCl *g* i la formació d'un producte de degradació similar, sinó idèntic, a la Cl *a* (Beer-Romero i Gest, 1987). En el nostre cas, l'exposició progressiva dels extractes de *Heliobacillus mobilis* a la llum i l'oxigen també va resultar en la formació d'aquest producte de degradació.

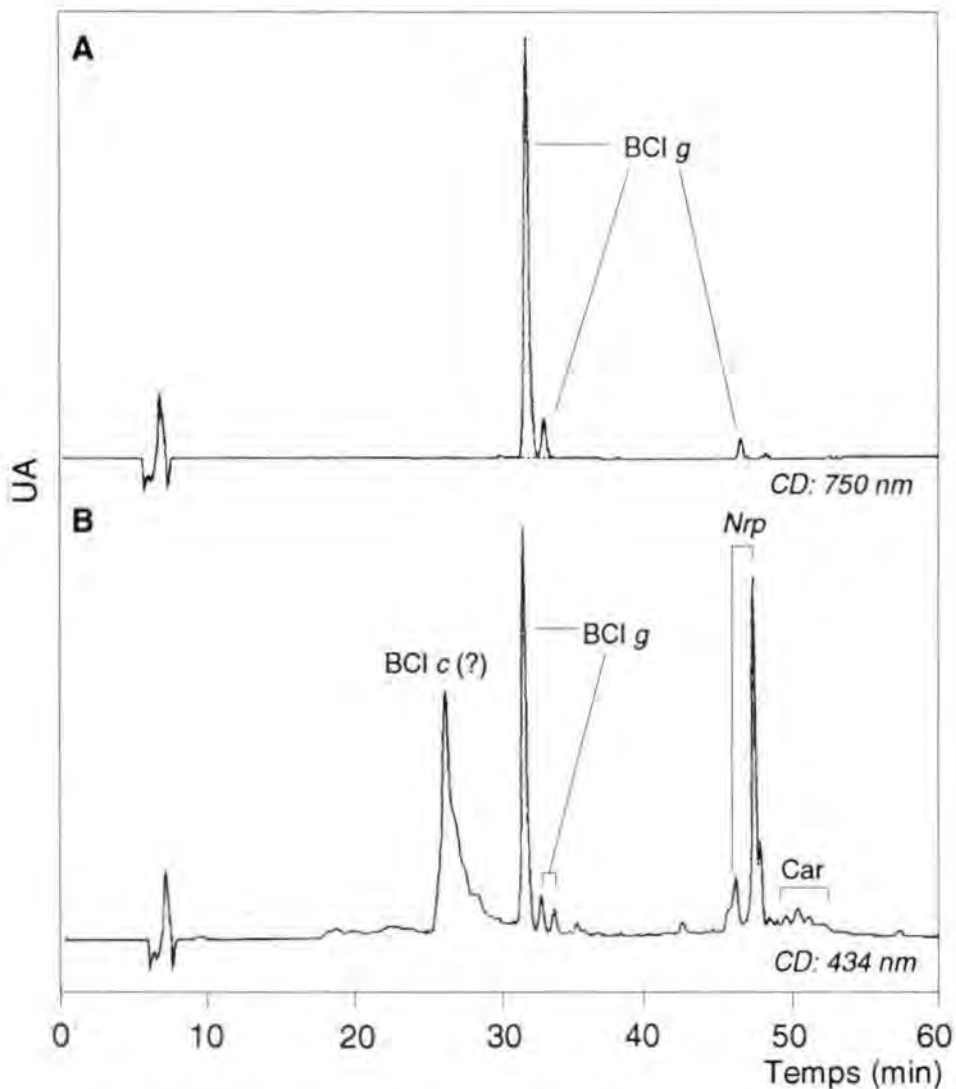


Figura 3.7. Cromatogrames de (A) l'extracte pigmentari original i (B) el fotooxidat de *Heliobacillus mobilis* on es mostren els principals pigments identificats.

Figure 3.7. Chromatograms of (A) the original pigment extract of *Heliobacillus mobilis* and (B) the same extract after the photooxidation, where the main photosynthetic pigments are shown.

La comparació del cromatograma de la mostra original amb el de l'extracte oxidat va mostrar una forta disminució del pic corresponent a la BCl *g* (31,5 min) i un increment del pic eluït als 26,02 min. Atenent al temps de retenció i al seu espectre d'absorció, és difícil d'associar aquest pigment d'origen degradatiu amb el derivat

clorofil·lic descrit per Beer-Romero i Gest (1987), atès que tant el temps de retenció de la Cl *a* (45,14 min) com els seus màxims d'absorció (432 i 663 nm) són diferents als mesurats pel derivat de la BCl *g*. D'acord amb aquestes observacions, aquest derivat degradatiu de la BCl *g* estaria més emparentat estructuralment i espectral amb la BCl *c* que no pas amb la Cl *a*. La confirmació d'aquesta hipòtesi necessitaria d'una anàlisi posterior mitjançant espectroscopia de masses per tal d'esbrinar la verdadera naturalesa d'aquest producte i de les vies de degradació que el produeixen.

3.2.2. Composició d'homòlegs en diferents espècies de bacteris verds del sofre

L'estudi de la composició d'homòlegs es va realitzar mitjançant l'anàlisi cromatogràfica dels pigments d'una gran varietat d'espècies dels bacteris verds del sofre crescudes en cultius purs o d'enriquiment. De cadascun d'ells es va mesurar el contingut relatiu basat en el % de l'alçada del pic respecte a la suma dels quatre homòlegs principals de cada BCl. El contingut relatiu d'homòlegs (CRH) va resultar significativament diferent d'un cultiu a un altre (Taula 3.2). La soca de *Chlorobium limicola* analitzada presentava com a homòleg principal el BCl *c*₃ (72,5%), mentre que el majoritari en la resta d'espècies verdes fou el BCl *c*₂. En el cas de *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum* que conté BCl *d*, l'homòleg majoritari també fou el tercer (BCl *d*₃). Com a tret comú per les espècies verdes, el primer homòleg era menys representatiu en espècies d'aigua dolça (0,7% a *Chlorobium limicola* i *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*) que en les espècies marines (18,3% i 20,5% a *Chlorobium chlorovibrioides* i *C. vibrioforme*, respectivament).

Pel que fa les espècies marrons, es van obtenir patrons pigmentaris diversos per les diferents espècies analitzades (Taula 3.2). Com a tret general el primer homòleg es troba pobrement representat amb valors de CRH inferiors al 3%. Una excepció a aquest patró el va constituir *Chlorobium phaeovibrioides* que presentava valors del 16% de BCl *e*₁.

3.3. DISCUSSIÓ

El principal avantatge del mètode cromatogràfic desenvolupat és que fa possible el separar, amb una elevada resolució i en un temps d'anàlisi relativament curt, les diferents bacterioclorsofil·les i els seus homòlegs. A més, l'escàs solapament entre els diferents pics permet la quantificació acurada dels mateixos. Tot i que altres mètodes cromatogràfics desenvolupats en els darrers anys tenen temps d'anàlisi generalment més curts (30–45 min) (Korthals i Steenberger, 1985; Bidigare *et al.*, 1985; Yacobi *et al.*, 1990; Hurley i Watras, 1991) el seu grau de resolució és pobre i no aconsegueixen una separació completa dels diferents homòlegs.

Tot i que les variacions estructurals que pot presentar una determinada BCl estan perfectament definides, el nombre d'homòlegs trobat realment en l'anàlitzar extractes pigmentaris de bacteris verds del sofre varia àmpliament segons la referència

Taula 3.2. Variacions en el contingut relatiu d'homòlegs (en %) de diferents soques de laboratori i enriquiments de poblacions naturals de bacteris fotosintètics verds del sofre.

Table 3.2. Different bacteriochlorophyll homologues composition (in %) of several enrichment cultures and laboratory strains of green photosynthetic sulfur bacteria.

Espècie	Nº total d'homòlegs	Nº BCl _F	%Alçada
<i>Chlorobium limicola</i>	10	(4) c ₁	0,70
		c ₂	20,53
		c ₃	72,48
		c ₄	6,29
<i>C. limicola</i> <i>f. thiosulfatophilum</i>	10-12	(4) c ₁	0,73
		c ₂	64,00
		c ₃	22,40
		c ₄	5,83
<i>C. chlorovibrioides</i>	13-15	(4) c ₁	18,28
		c ₂	62,41
		c ₃	15,05
		c ₄	4,26
<i>C. tepidum</i>	8	(4) c ₁	2,11
		c ₂	57,57
		c ₃	33,17
		c ₄	7,16
<i>C. vibrioforme</i>	8	(4) c ₁	20,45
		c ₂	53,67
		c ₃	22,45
		c ₄	3,42
<i>C. vibrioforme</i> <i>f. thiosulfatophilum</i>	9	(4) d ₁	6,97
		d ₂	20,78
		d ₃	50,34
		d ₄	21,92
<i>Pelodictyon</i> <i>clathratiforme</i>	8	(3) d' ₁	52,07
		d' ₂	32,45
<i>C. phaeobacteroides</i>	14-15	(4) e ₁	3,07
		e ₂	50,21
		e ₃	32,18
		e ₄	32,43
<i>C. phaeovibrioides</i>	12-14	(4) e ₁	16,27
		e ₂	45,44
		e ₃	27,13
		e ₄	11,16
<i>P. phaeoclathratiforme</i>	12-14	(4) e ₁	0,29
		e ₂	12,92
		e ₃	40,07
		e ₄	46,72
<i>P. phaeum</i>	12	(4) e ₁	0,27
		e ₂	38,32
		e ₃	32,61
		e ₄	28,80

bibliogràfica consultada. La majoria d'autors citen fins a quatre formes homòlogues de BCl *c*, *d* i *e*, ja sigui en forma de pics separats o solapats en una banda més o menys ampla (Taula 3.3) (Korthals i Steenbergen, 1981, Repeta *et al.*, 1989, Yacobi *et al.*, 1990, Hurley i Watras, 1991). La separació dels homòlegs en conjunts formats per un nombre variable de pics és una característica comuna dels diferents mètodes descrits. Amb el mètode desenvolupat en aquest treball, el patró d'elució més comú és el d'un conjunt de quatre pics principals, seguit d'un segon grup amb nombre més o menys variable de pics secundaris. Chow *et al.* (1978) va obtenir un patró molt similar al separar els pigments fotosintètics de *Chlorobium limicola* mitjançant cromatografia preparativa tot i que les particularitats analítiques i tècniques del sistema utilitzat el fan completament diferent al nostre. Segons aquests autors, els homòlegs secundaris eluïts en el segon bloc serien atribuïbles a formes homòlogues de BCl esterificades amb alcohols de diferent naturalesa. Els resultats presentats indiquen que el nombre total d'homòlegs per una determinada BCl pot oscil·lar entre 7 i 14 per les espècies verdes i entre 10 a 15 per les marrons. D'acord amb els treballs de Chow *et al.* (1978) i Uehara *et al.* (1994) els quatre homòlegs principals que conformen el primer conjunt es van identificar com a formes de BCl *c* esterificades amb farnesil i que presentaven variació en els substituents C-8 i C-12 de l'anell tetrapirròlic. Així, els quatre homòlegs principals trobats en les espècies verdes amb BCl *c* es van identificar, d'acord amb la nomenclatura de Smith (1994), com: [E, M] BCl *c_F*, [E,E] BCl *c_F*, [Pr,E] BCl *c_F* i [I,E] BCl *c_F*. Anàlogament, els quatre homòlegs principals de la BCl *d* serien: [E, M] BCl *d_F*, [E,E] BCl *d_F*, [Pr,E] BCl *d_F* i [I,E] BCl *d_F*. Pel que fa les espècies marrons, els quatre homòlegs principals de la BCl *e* es van identificar com: [E,E] BCl *e_F*, [Pr,E] BCl *e_F*, [I,E] BCl *e_F* i [N,E] BCl *e_F*. Aquestes identifications, tot i que no ha estat corroborades per espectroscopia de masses, estarien d'acord amb els resultats presentats prèviament per Gloe *et al.* (1975), Brockmann (1976) i Senge i Smith (1995).

Pel que fa al segon grup d'homòlegs, es fa difícil d'explicar la seva naturalesa, atenent només a les possibles variacions en el grau de metilació dels radicals C-8 i C-12 del anell tetrapirròlic. En treballs anteriors s'han considerat aquests components minoritaris com a pigments accesoris per incrementar la captació de llum i/o la transferència d'energia dins l'antena bacteriana o simplement, com a productes resultants de la síntesi aberrant de pigments en les etapes tardanes del creixement (Caple *et al.*, 1978; Nozawa *et al.*, 1991a, b, 1992). Atès que el contingut d'aquests homòlegs secundaris augmenta amb l'edat del cultiu (veure Capítol 4) sembla plausible contemplar aquests pigments com a formes aberrants que, malgrat tot, conservin la seva funcionalitat com antena fotosintètica, ja que el seu espectre d'absorció és idèntic al dels quatre homòlegs principals. Des del punt de vista estructural i d'acord amb treballs anteriors (Caple *et al.*, 1978) es van considerar aquests pigments minoritaris com a formes esterificades amb una gran varietat d'alcohols com ara el geranilgeraniol, el 4-undecil-2-furanmetanol, el 10,14-tetrahidrogeranilgeraniol i el fitol d'entre altres. La naturalesa exacte d'aquests alcohols s'hauria de confirmar mitjançant espectroscòpia de masses. La possibilitat que els bacteris verds del sofre puguin sintetitzar molècules de BCl amb alcohols esterificats en C-17 diferents del farnesil també ha estat apuntada prèviament (Repeta *et al.*, 1989) i és un fenomen comú en *Cloroflexus* (Larsen *et al.*, 1995).

Taula 3.3. Comparació entre el nombre d'homòlegs de bacterioclorigil·les de diverses espècies dels bacteris verds del sofre detectats per diferents autors i els obtinguts amb l'aplicació del mètode descrit en aquest capítol. (ne): no especificat.

Table 3.3. Comparison between the number of bacteriochlorophyll homologues from different species of green sulfur bacteria reported by several authors and those found after the application of the HPLC method hereby described. (ne): not specified.

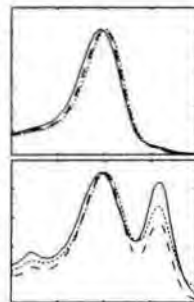
Espècie	BCI	Nº Homòlegs BCI _p	Total	Referència
a) Espècies verdes				
<i>Chlorobium limicola</i>	c	4	14	Chow et al. (1978)
Altres	c	ne	4	Korthals i Steenbergen (1981)
	d	ne	1	
<i>Prostecochloris aestuarii</i>	c	ne	2	Yacobi et al. (1990)
<i>C. limicola</i> f. <i>thiosulfat.</i>	d	ne	4	Hurley i Watras (1991)
<i>Chlorobium</i> NZC	c	ne	4	
<i>C. limicola</i>	c	4	10	Aquest treball
<i>C. limicola</i> f. <i>thiosulfat.</i>	c	4	10–12	*
<i>C. chlorovibrioides</i>	c	4	13–15	*
<i>C. tepidum</i>	c	4	10	*
<i>C. vibrioforme</i>	c	4	8	*
<i>C. vibriof.</i> f. <i>thiosulfat.</i>	d	4	11	*
<i>Pelodictyon clathratiforme</i>	d	3	8	*
b) Espècies marrons				
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	e	ne	3	Korthals i Steenbergen (1981)
Altres	e	3	4	Repeta et al. (1989)
<i>C. phaeobacteroides</i>	e	ne	3	Yacobi et al. (1990)
<i>C. phaeobacteroides</i>	e	ne	4	Hurley i Watras (1991)
<i>C. phaeobacteroides</i>	e	4	14–15	Aquest treball
<i>C. phaeovibrioides</i>	e	4	14	*
<i>P. phaeoclathratiforme</i>	e	4	12–14	*
<i>P. phaeum</i>	e	4	12	*

Pel que fa les BCIs c, d i e sembla evident que les tres es troben emparentades malgrat existir una certa variabilitat estructural. Aquesta relació estructural és molt clara en el cas de les BCIs c i d, on la única diferència és la metilació en d-20 en el cas de la BCI c (Kenner et al., 1976), la qual cosa ha portat a suggerir la BCI d com un intermediari en la biosíntesi de la BCI c (Brune et al., 1987a; Larsen, 1994). D'altra banda, la relació evolutiva de la BCI e –caracteritzada per un grup formil al carboni 7 – seria més problemàtica ja que aquest pigment es troba més emparentat amb la Cl b eucariota que no pas amb les altres clorigil·les bacterianes (Otte et al., 1993). En base a aquestes consideracions, hom esperaria un comportament cromatogràfic similar per les tres bacterioclorigil·les, i que és el que efectivament s'observa en els patrons d'elució de les BCI c, d i e presents en les

soques estudiades. Malgrat aquesta similitud, l'anàlisi cromatogràfic d'extractes pigmentaris procedents de poblacions naturals de bacteris verds del sofre creixent sota condicions lumíniques diverses (Capítol 5) ha portat a pensar que la diversitat en formes homòlogues és encara més elevada. Aquesta diversitat estructural podria jugar un paper clau en l'adaptació de les diferents espècies de bacteris verds del sofre a climes lumínics baixos.

Analitzant els resultats sembla clar que la distribució i el contingut dels diferents homòlegs no són caràcters fenotípics constants a cada espècie sinó que varien en funció de les condicions ambientals en les que ha crescut. Per tant, resulta evident que una anàlisi d'aquest tipus no té un valor taxonòmic real tal i com s'havia especulat (Oelze, 1985). Malgrat això, l'anàlisi amb HPLC ofereix la possibilitat de realitzar estudis acurats de la importància relativa de cadascun dels homòlegs i obtenir-ne interessants conclusions fisiològiques sobre la seva contribució individual dins l'antena fotosintètica. De fet, el possible paper adaptatiu dels diferents homòlegs en l'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum ja ha estat avançat per diversos autors (Repeta *et al.*, 1989; Bobe *et al.*, 1990; Huster i Smith, 1990; Overmann *et al.*, 1992) i és objecte d'estudi en els capítols següents. Cal destacar finalment, que el mètode presentat constitueix no només un pas més en l'anàlisi dels pigments fotosintètics dels microorganismes procariotes i eucariotes, sinó que es revela com una eina útil per l'experimentació i la investigació dels processos fisiològics que controlen l'adaptació pigmentària en els bacteris verds.

**4. FISIOLOGIA DE
L'ADAPTACIÓ DELS
BACTERIS VERDS DEL
SOFRE A LES BAIXES
INTENSITATS DE LLUM**



4.1. INTRODUCCIÓ

Els bacteris verds del sofre posseeixen un dels sistemes antena més complexos dins del grup dels bacteris fotosintètics. A l'heterogeneïtat pigmentària que els caracteritza, s'hi afegeix la presència de dos tipus de complexos antena extra-membranosos –els clorosomes i les proteïnes FMO– (Blankenship *et al.*, 1995). A més, la correcta orientació i distribució dels diferents homòlegs i agregats dins la matriu clorosòmica sembla tenir un paper clau a l'hora d'optimitzar la transferència d'energia des de les pròpies molècules antena fins als centres de reacció presents a la membrana, a través de la làmina basal del clorosoma i les proteïnes FMO (Mimuro *et al.*, 1989; Blankenship *et al.*, 1990; Causgrove *et al.*, 1990; 1992). Malgrat estar demostrada la contribució d'aquests elements en l'absorció de la llum i en la posterior transferència de l'excitació, la participació específica de cadascun d'ells en l'adaptació dels bacteris verds a les baixes intensitats de llum no està del tot resolta.

Les principals qüestions que hom es va plantejar al començament estaven relacionades amb els mecanismes fisiològics responsables de l'adaptació lumínica en els bacteris verds del sofre. Per una banda, es volia conèixer el perquè de l'elevada heterogeneïtat pel que fa a formes homòlogues en els clorosomes bacterians i, per l'altra, precisar la funció específica d'aquests pigments en l'adaptació a les baixes intensitats de llum. L'elevada diversitat pigmentària en els bacteris verds del sofre ha estat proposada com un factor determinant a l'hora d'explicar la bona adaptació d'aquests bacteris a créixer sota climes lumínics limitants. L'heterogeneïtat en pigments antena facilitaria l'agregació de les diferents molècules de BCl dins el clorosoma i, per tant, s'augmentaria la quantitat de pigment que es pot acumular dins un espai reduït (Caple *et al.*, 1978; Blankenship *et al.*, 1988; Ormerod *et al.*, 1993). A més d'aquest paper estructural, l'elevat nombre d'homòlegs podria afavorir, o bé una absorció de la llum en un rang més ample de longituds d'ona (Smith i Bobe, 1987; Brune *et al.*, 1987a) o bé optimitzar la transferència de l'excitació des de l'antena fins als centres de reacció (Otte *et al.*, 1991; 1993; van Noort *et al.*, 1994). Fins el moment no s'han presentat resultats concloents que confirmin alguna d'aquestes hipòtesis, tot i que en treballs recents es proposa que les variacions en el contingut de les diferents molècules de BCl podrien estar relacionades amb l'adaptació lumínica, tant en bacteris verds del sofre (Bobe *et al.*, 1990) com en bacteris verds filamentosos (Larsen *et al.*, 1994). L'augment del grau d'alquilació de les molècules antena de BCl *c* ha estat proposat també com una de les adaptacions de *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum* a canvis en la intensitat de llum disponible pel creixement (Huster i Smith, 1990). Malgrat tot, el paper específic d'aquestes molècules resulta encara incert.

Per tal de determinar la contribució exacte dels diferents homòlegs en l'adaptació lumínica dels bacteris verds del sofre, es van incubar diferents espècies, tant verdes com marrons, a intensitats baixes de llum i se'n va analitzar la composició pigmentària així com les variacions en el contingut relatiu dels diferents homòlegs mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució.

El primer bloc d'experiments es va basar en estudiar les diferències a nivell adaptatiu d'aquest grup de bacteris al creixement a intensitat baixes de llum. D'acord amb aquest objectiu, es van fer créixer dues espècies verdes –*Chlorobium limicola* i *C. chlorovibrioides*– i dues de marrons –*Chlorobium phaeo-bacteroides* i *C. phaeovibrioides*– a diferents intensitats de llum (50; 5; 1; 0,5 i 0,1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i se'n van mesurar les variacions pigmentàries en la seva antena fotosintètica després de tres generacions. Els resultats van mostrar dos tipus de respostes: una de quantitativa, comuna tant en les espècies verdes com en les marrons, basada en el increment del contingut de pigments antena quan es disminuïa la intensitat de llum des de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i una segona, qualitativa, basada en un re-ajustament del contingut relatiu d'homòlegs a intensitats crítiques de llum ($< 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Una vegada demostrat que els diferents homòlegs de les BCl responien qualitativament a les variacions en la intensitat de llum, un segon objectiu fou investigar la pauta d'aquest canvi durant el creixement. D'aquesta manera es pretenia determinar la cinètica de variació dels diferents homòlegs de la BCl *e* en condicions de limitació lumínica i obtenir evidències de les relacions estequiomètriques entre els diferents pigments antena i del seu canvi durant el procés fotoadaptatiu.

Conegut el tipus de resposta global dels bacteris verds del sofre davant la reducció de la intensitat de llum, l'objectiu dels estudis que es presenten en el tercer bloc de resultats fou el d'aclarir el grau de fotoadaptació dels diferents elements sub-cel·lulars –clorosomes i complexos antena associats a membranes–. Amb aquest propòsit es va fer créixer *Chlorobium tepidum*, un bacteri termòfil verd del sofre, a diferents intensitats de llum i es van mesurar els canvis en les propietats espectrals i la composició pigmentària mitjançant espectrofotometria, fluorometria i cromatografia líquida d'alta resolució tant en les cèl·lules bacterianes com en les fraccions fotosintètiques sub-cel·lulars. Els resultats van indicar que l'adaptació pigmentària en aquesta espècie és mixte, comprnent tant un increment en el contingut de pigments antena com un canvi en la distribució dels homòlegs de la BCl *c*. Aquestes adaptacions determinen una modificació tant de les propietats espectrals del complex antena com de la seva organització.

4.2. RESULTATS

4.2.1. Adaptació dels pigments antena dels bacteris verds del sofre a les intensitats baixes de llum

4.2.1.1. Condicions experimentals

Pels experiments d'adaptació es van fer créixer per duplicat cultius purs de dues espècies verdes –*Chlorobium limicola* i *C. chlorovibrioides*– i dues marrons –*Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides*– en ampolles de vidre de 120 ml de capacitat completament plenes amb medi Pfennig i tapades hermèticament amb taps de goma. Les ampolles es van inocular amb 20 ml dels corresponents cultius bacterians en creixement exponencial (volum final d'inòcul del 16%) i es varen

incubar a 25°C en una cambra termostatitzada construïda especialment per a tal efecte. La il·luminació es va subministrar de forma continuada mitjançant una bombeta fluorescent de 25W (Philips SL-25) que proporcionava llum blanca enriquida entre 500 i 600 nm (Figura 4.1.A). La intensitat de llum es va mesurar entre 300 i 900 nm amb un espectroradiòmetre LI-COR 1800-1W. Les diferents intensitats es van aconseguir col·locant les ampolles de cultiu a una distància apropiada de la font de llum. Els cultius a 0,5 i 0,1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van ombrejar amb quatre làmines de paper blanc per tal d'aconseguir la intensitat de llum desitjada sense alterar la seva distribució espectral (Figura 4.1.B). Els cultius incubats a 0,1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van suplementar amb acetat de sodi (concentració final de 2 mmol l⁻¹) per afavorir el creixement fotoautotròfic.

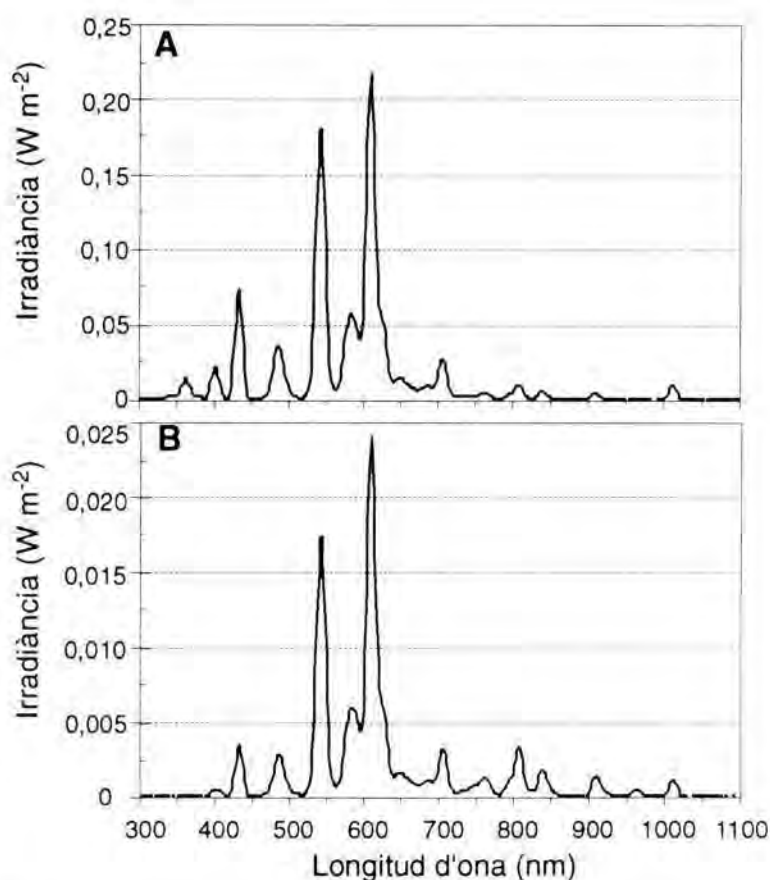


Figura 4.1. (A) Espectre lumínic de la font de llum utilitzada en els experiments. La llum subministrada per la bombeta estava enriquida en longitud d'ona entre 500 i 600 nm. (B) El mateix que en A però amb un ombrejat de quatre làmines de paper blanc.

Figure 4.1. (A) Spectral distribution of the light provided by the fluorescent lamp used in the different experimental sets. Light was enriched between 500 and 600 nm. (B) Same as in A but shaded with four paper sheets.

El creixement es va monitoritzar rutinàriament mesurant la densitat òptica dels cultius a 650 nm. Les mostres es prenen a diferents intervals de temps directament a través del tap de goma amb una xeringa estèril. El volum de mostra retirat era substituït amb nitrogen gas. Una vegada presa la mostra es mesurava

immediatament l'espectre d'absorció *in vivo* entre 350 i 900 nm. La concentració de sulfhídric en els cultius es mantenia a 1 mmol l⁻¹ mitjançant l'addició periòdica de volums adients d'una sol.lució 100 mmol l⁻¹ de Na₂S. Els cultius incubats a 50, 5 i 1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van retirar després de 13 dies mentre que els incubats a 0,5 i 0,1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ho foren després de 23 i 128 dies, respectivament.

4.2.1.2. Creixement

Els principals paràmetres de creixement calculats per les quatre espècies estudiades a les diferents intensitats de llum es recullen a la taula 4.1. La taxa de creixement calculada per les diferents espècies va estar relacionada amb la intensitat de llum disponible per a cada tractament, mostrant saturació a intensitats superiors a 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4.2). Per sota d'aquest valor es va deduir una relació lineal entre ambdós paràmetres. Això no es va acomplir en *Chlorobium limicola* ja que aquesta espècie no va presentar creixement per sota de 1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aquest fet sembla evidenciar les dificultats d'aquest bacteri, i en general de totes les espècies verdes dels bacteris verds del sofre, per créixer a intensitats baixes de llum. D'acord amb les taxes de creixement dels diferents cultius, les intensitats de llum es van catalogar com a *saturants* (50 i 5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), *sub-òptimes* (1 i 0,5 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i *crítiques* (0,1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 4.3).

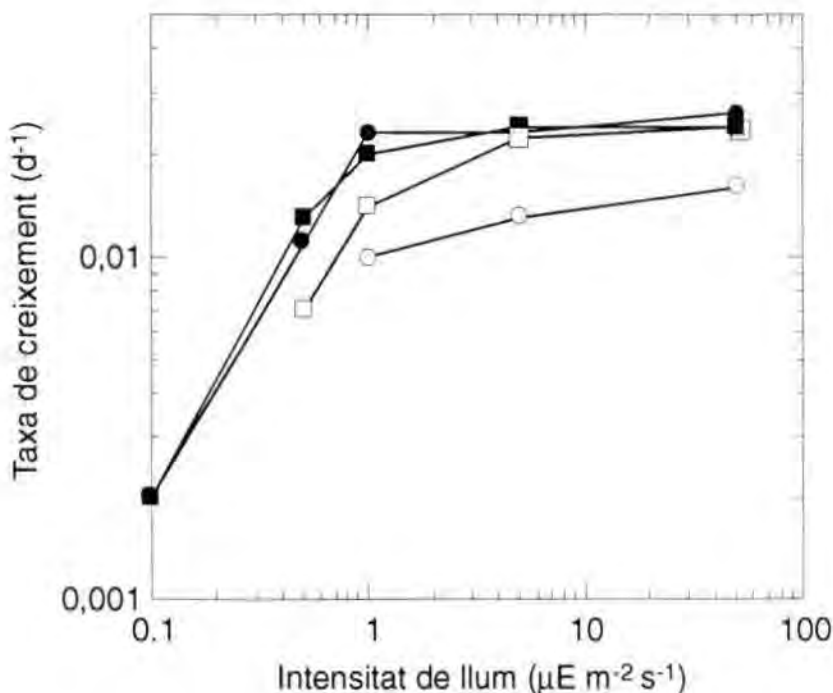


Figura 4.2. Efecte de la intensitat de la llum en la taxa de creixement de *Chlorobium limicola* (○), *C. chlorovibrioides* (□), *C. phaeobacteroides* (●) i *C. phaeovibrioides* (■).

Figure 4.2. Effect of light intensity on the growth rate of *Chlorobium limicola* (○), *C. chlorovibrioides* (□), *C. phaeobacteroides* (●), and *C. phaeovibrioides* (■).

Taula 4.1. Principals paràmetres de creixement calculats per *Chlorobium limicola* (CL), *C. chlorovibrioides* (CC), *C. phaeobacteroides* (CP) i *C. phaeovibrioides* (CPv) crescuts a diferents intensitats de llum. Els cultius a $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van suplementar amb acetat sòdic (concentració final de 2mmol l^{-1}).

Table 4.1. Main growth parameters calculated for *Chlorobium limicola* (CL), *C. chlorovibrioides* (CC), *C. phaeobacteroides* (CP) and *C. phaeovibrioides* (CPv) grown at different light intensities. Cultures at $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were supplemented with sodium acetate (final concentration of 2mmol l^{-1}).

Espècie	Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Duplicacions	Temps Creix. (dies)	t_g^a (dies)	μ_{spec}^b (dies^{-1})
CL	50	3,69	13	3,52	0,016
	5	2,95	13	4,41	0,013
	1	3,23	19	5,88	0,010
	0,5*	0,19	23	–	–
	0,1*	0,10	128	–	–
CC	50	3,86	13	3,37	0,024
	5	3,66	13	3,55	0,022
	1	3,25	19	5,85	0,014
	0,5	1,89	23	12,17	0,007
	0,1*	0,056	128	–	–
CP	50	4,03	13	3,23	0,026
	5	3,65	13	3,56	0,023
	1	3,62	13	3,59	0,023
	0,5	3,17	23	7,25	0,011
	0,1	3,38	128	38,51	0,002
CPv	50	3,81	13	3,41	0,024
	5	3,77	13	3,45	0,024
	1	3,21	13	4,05	0,020
	0,5	2,04	23	6,37	0,013
	0,1	3,12	128	40,77	0,002

^a: Temps de generació

^b: Taxa de creixement específica

* Es considera manca de creixement quan no es superen les 0,3 duplicacions.

^a: Duplication time.

^b: Specific growth rate.

* No growth was considered when duplications were less than 0.3.

En el moment de retirar els cultius, tots ells excepte *Chlorobium limicola*, incubats a intensitats de llum inferiors a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, presentaven una densitat òptica similar ($\text{DO}_{650}=0,5$). *C. chlorovibrioides* tampoc va créixer a $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ però si va fer-ho a $0,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ amb una taxa de creixement $0,007 \text{ d}^{-1}$. Les espècies marrons en canvi, van créixer a totes les condicions lumíniques. Els cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides* incubats a $0,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ van créixer a taxes específiques de $0,011$ i $0,013 \text{ d}^{-1}$, respectivament. A $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aquestes dues espècies van créixer només quan es van suplementar els cultius amb acetat sòdic. Tot i així, les taxes específiques de creixement foren considerablement més baixes ($\mu_s=0,002 \text{ d}^{-1}$ per ambdues espècies).

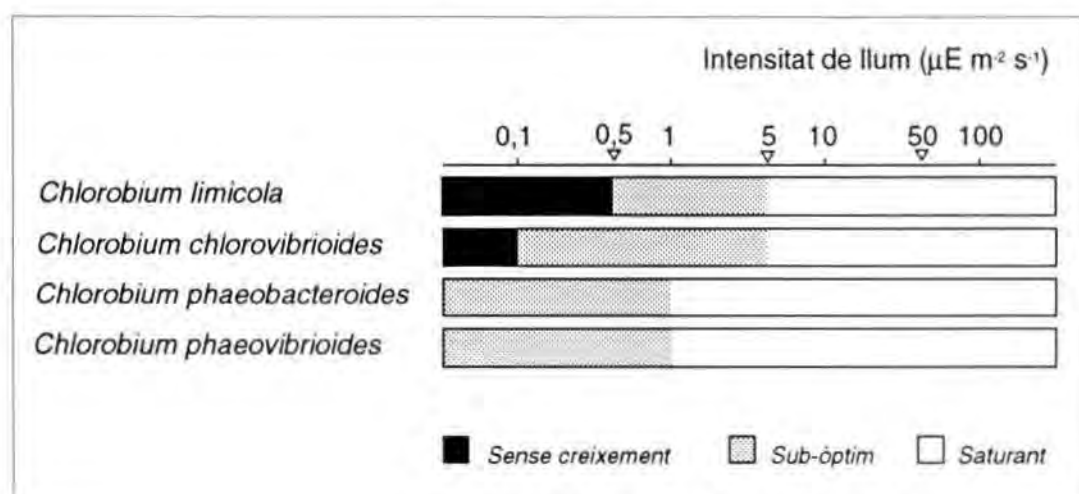


Figura 4.3. Creixement de les soques estudiades a les intensitats de llum assajades. Les intensitats es van catalogar com a saturants, sub-òptimes i crítiques en funció de les taxes de creixement dels diferents cultius (veure taula 4.1).

Figure 4.3. Growth of the studied strains at the different light intensities tested. Intensities were grouped as saturating, sub-optimal, and critical according to the growth rate of the corresponding culture (see table 4.1).

4.2.1.3. Composició pigmentària

Una primera resposta observada en els cultius incubats a intensitats baixes de llum fou el desplaçament del màxim d'absorció *in vivo* de les BCl *c* i *e* en la regió Q_y cap a longituds d'ona superiors (Taula 4.2). Aquest desplaçament fou de fins a 5 nm en el cas de *Chlorobium limicola* i de 4 nm en el cas de *C. chlorovibrioides*. En les espècies marrons aquest desplaçament del màxim Q_y va ser més accentuat, passant de 715 i 712 nm en els cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides* incubats a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 722 i 723 nm en els cultius crescuts a $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivament. A més d'aquest desplaçament, també es va detectar un augment en l'amplada de la banda associada al màxim Q_y .

L'anàlisi quantitativa dels pigments fotosintètics a partir dels extractes acetònics dels diferents cultius va revelar un increment general del contingut específic dels pigments antena en les quatre espècies de *Chlorobium* estudiades. Aquest aug-

Taula 4.2. Màxims d'absorció (a) i amplades de la banda Q_y , (b) (en nanòmetres) de la BCl *c/e* per les quatre espècies estudiades a les diferents intensitats de llum.

Table 4.2. *Bacteriochlorophyll c-e* Q_y absorption maxima (a) and Q_y bandwidth (b) (both in nm) of the four bacterial species at different light conditions.

Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	CL*		CC*		CP*		CPv*	
	a	b	a	b	a	b	a	b
50	755	58	750	71	715	60	712	60
5	760	70	749	70	721	62	717	61
1	760	71	751	74	725	64	719	64
0,5	—	—	754	75	722	65	722	64
0,1	—	—	—	—	723	65	723	64

*CL: *Chlorobium limicola*; CC: *C. Chlorovibrioides*; CP: *C. phaeobacteroides*; CPv: *C. phaeovibrioides*.

(—): Sense creixement (nombre de duplicacions inferior a 0,3).

(—): No growth (doublings less than 0.3).

ment va assolir el seu màxim en aquells cultius incubats a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Taula 4.3). Curiosament, els cultius incubats a intensitats de llum inferiors a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ van presentar continguts específics de bacterioclorofil·la més baixos. *Chlorobium limicola* va mostrar un comportament irregular degut a la seva incapacitat per créixer a intensitats de llum inferiors a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En aquesta espècie, la intensitat de llum on es va mesurar el màxim contingut específic de BCl *c* fou de $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. D'altra banda, el contingut específic de carotenoides –clorobactè i isorrenieratè en les espècies verdes i marrons, respectivament– va exhibir pautes de variació similars a les mostrades per les bacterioclorofil·les. En aquest cas, els valors màxims també es van mesurar en els cultius incubats a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Per sota d'aquesta intensitat també es va registrar una disminució del contingut específic de carotenoides tot i que en aquest cas fou més dràstica que la mesurada per les bacterioclorofil·les. En general, el contingut específic de carotenoides en les espècies verdes fou sempre inferior al mesurat en les marrons a totes les intensitats de llum analitzades, fet que ve confirmat pels valors de l'índex Car:BCl, que foren fins a deu vegades més baixos en les espècies verdes que en les marrons.

4.2.1.4. Anàlisi cromatogràfica

L'anàlisi amb HPLC va permetre quantificar els possibles canvis en el contingut relatiu dels homòlegs de la BCl en els diferents cultius. La quantificació es va realitzar únicament sobre els quatre homòlegs principals –BCl_F– ja que són aquests els que representen la major part del contingut total de BCl. Tant els patrons d'elució dels diferents homòlegs de les BCl *c* i *e* com la nomenclatura utilitzada està d'acord amb les especificacions citades al capítol 3. La quantificació es va realitzar mesurant el percentatge de l'alçada dels pics corresponents en els cromatogrames obtinguts (Figures 4.4 i 4.5).

Taula 4.3. Continguts específics dels diferents pigments i proporcions entre aquests pels cultius de *Chlorobium limicola* (CL), *C. chlorovibrioides* (CC), *C. phaeobacteroides* (CP) i *C. phaeovibrioides* (CPv) incubats a les diferents condicions lumíniques. Els cultius incubats a $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van suplementar amb acetat sòdic (concentració final de 2 mmol l^{-1}).

Table 4.3. Specific pigment contents and pigment ratios for *Chlorobium limicola* (CL), *C. chlorovibrioides* (CC), *C. phaeobacteroides* (CP) and *C. phaeovibrioides* (CPv) grown at different light conditions. Cultures placed at $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were supplemented with sodium acetate (final concentration of 2 mmol l^{-1}).

Espècie	Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	[Bcl c-e] _{esp} ($\mu\text{g BCl mg prot}^{-1}$)	[Isr] _{esp} ($\mu\text{g Isr mg prot}^{-1}$)	Isr : Bcl e
CL	50	46,7 ± 3	4,1 ± 0,4	0,09
	5	87,0 ± 7	6,2 ± 0,6	0,07
	1	83,5 ± 3	7,0 ± 0,5	0,08
	0,5	-	-	-
	0,1	-	-	-
CC	50	91,6 ± 17	4,9 ± 0,6	0,05
	5	91,7 ± 11	4,5 ± 0,0	0,05
	1	99,6 ± 7	5,5 ± 0,6	0,05
	0,5	90,8 ± 16	4,5 ± 0,5	0,05
	0,1	-	-	-
CP	50	38,6 ± 2	21,3 ± 0,9	0,55
	5	65,6 ± 10	34,8 ± 3,2	0,53
	1	74,1 ± 14	36,0 ± 4,0	0,48
	0,5	42,8 ± 1	20,7 ± 0,0	0,48
	0,1	21,0 ± 3	10,2 ± 1,7	0,48
CPv	50	67,3 ± 3	32,2 ± 3,2	0,48
	5	85,1 ± 8	32,9 ± 3,0	0,38
	1	100,1 ± 2	43,9 ± 0,2	0,43
	0,5	93,4 ± 3	39,5 ± 0,3	0,42
	0,1	78,9 ± 3	27,2 ± 1,7	0,35

(-): Sense creixement (nombre de duplicacions inferior a 0,3).

(-): No growth (doublings less than 0,3).

Les variacions en el contingut relatiu d'homòlegs (CRH) mesurades en funció de la intensitat de llum es mostren en la figura 4.6. Les espècies verdes no van presentar canvis significatius en el CRH a les diferents intensitats de llum analitzades. Únicament *Chlorobium chlorovibrioides* va mostrar una disminució apreciable en el contingut de BCl c₁ en els cultius incubats a intensitats inferiors a $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Per sota d'aquesta intensitat, el CRH fou aproximadament el mateix que el mesurat en els cultiu control i en l'indòcul (Taula 4.4).

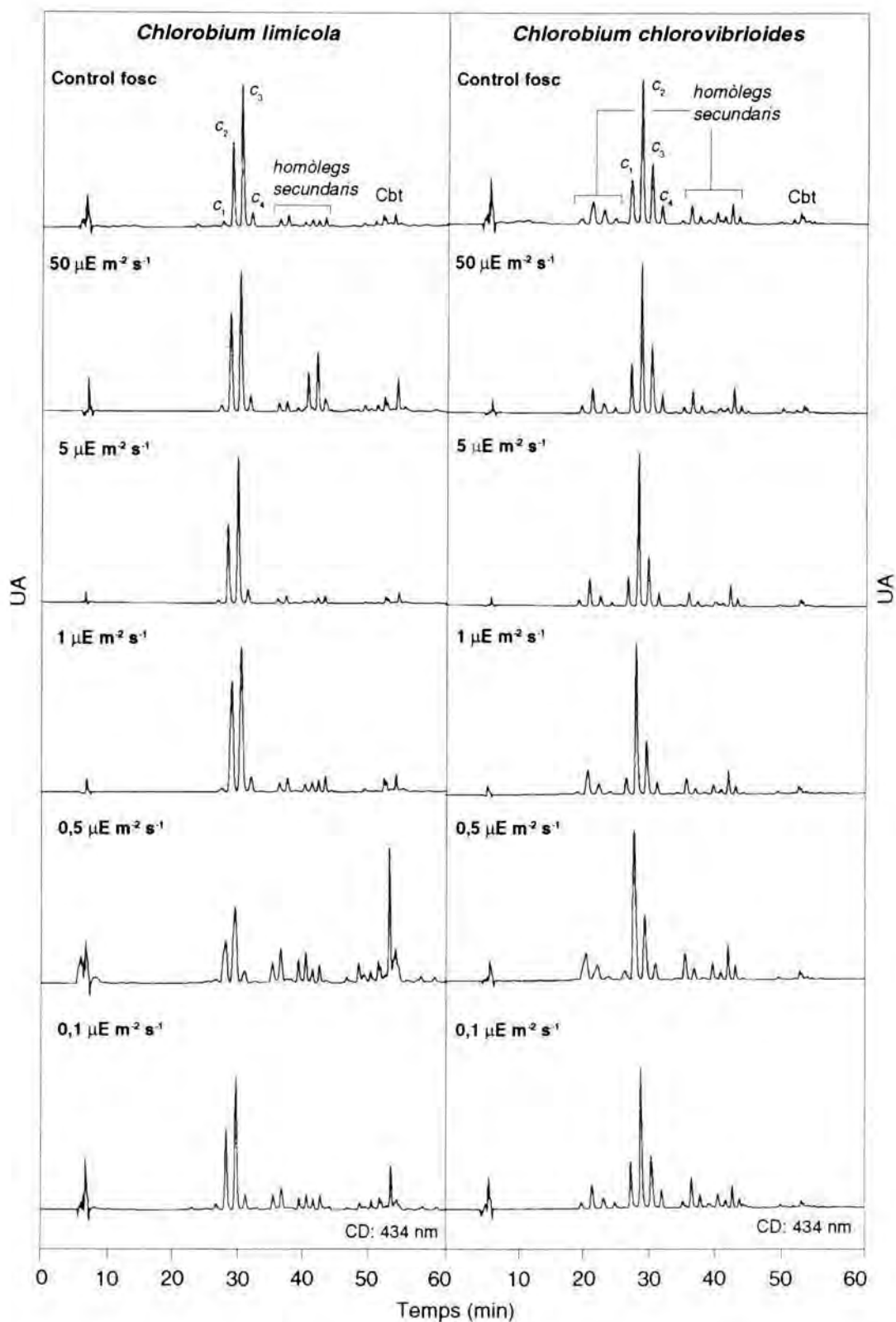


Figura 4.4. Cromatogrames dels extractes pigmentaris dels cultius de *Chlorobium limicola* i *C. chlorovibrioides* a diferents intensitats de llum.

Figure 4.4. HPLC pigment traces of *Chlorobium limicola* and *C. chlorovibrioides* incubated at different light intensities.

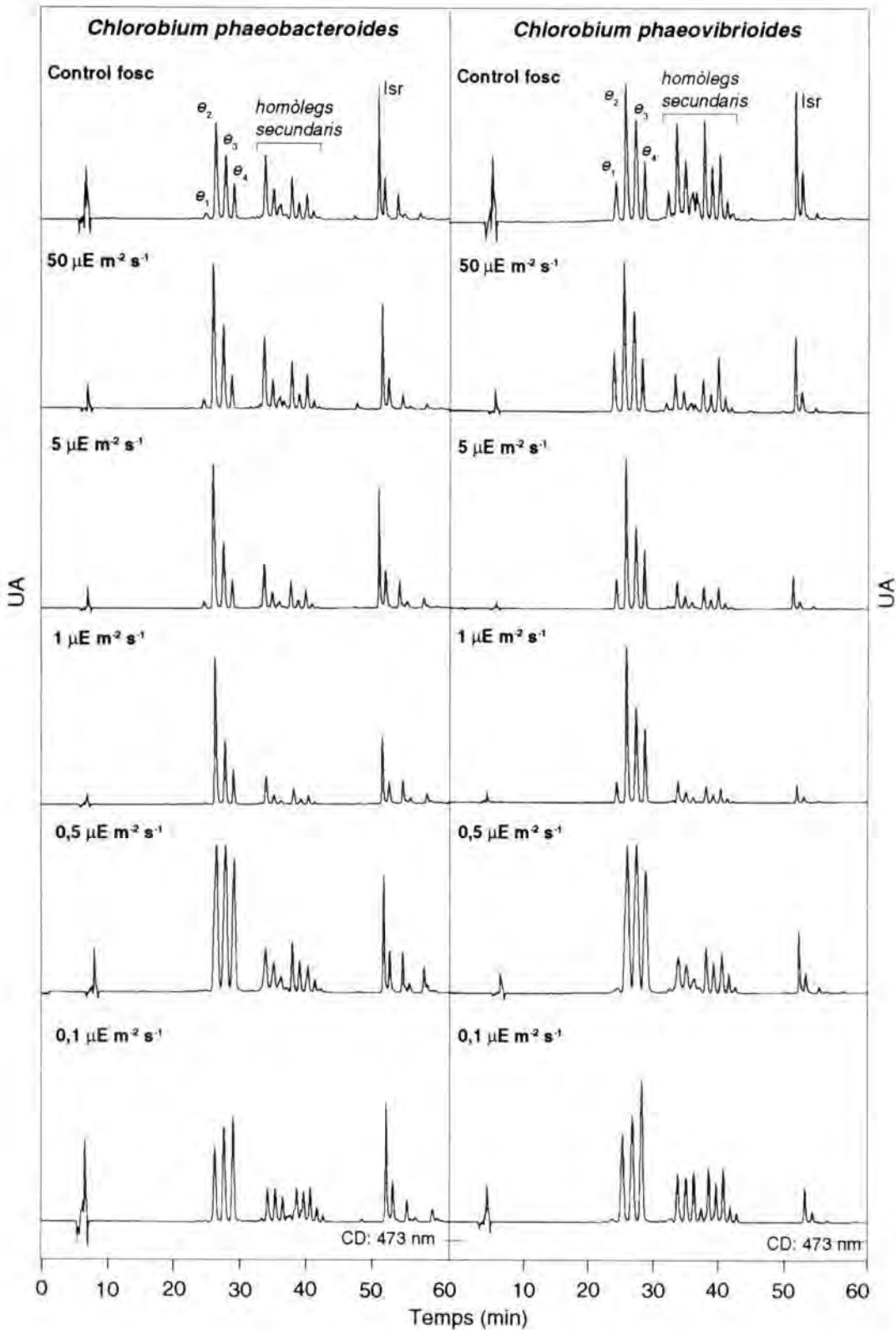


Figura 4.5. Cromatogrames dels extractes pigmentaris dels cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides* a diferents intensitats de llum.

Figure 4.5. HPLC pigment traces of *Chlorobium phaeobacteroides* and *C. phaeovibrioides* incubated at different light intensities.

Les espècies marrons en canvi, van mostrar variacions evidents en quant la composició relativa dels diferents homòlegs pels cultius crescuts a baixes intensitats de llum. En aquestes espècies, la distribució dels quatre homòlegs principals de la BCl e va diferir notablement entre els cultius crescuts a intensitats de llum superiors a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (patrons caracteritzats per la dominància del segon homòleg) als incubats a intensitats de llum inferiors a aquest valor (caracteritzats per un contingut similar de BCl e_2 , e_3 i e_4 a $0,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i per l'absència del primer homòleg i la dominància de BCl e_4 a intensitats de $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 4.5).

Pel que fa al contingut relatiu dels homòlegs secundaris (CRHS), aquest no va mostrar variacions destacables en cap de les quatre espècies a les intensitats de llum utilitzades. Això fou vàlid també pels cultius no crescuts i pels corresponents controls. Aquest fet sembla suggerir una escassa representativitat d'aquests components en la fisiologia pigmentària de *Chlorobium*, al menys pel que fa al mecanisme de fotoadaptació. Malgrat això, es van detectar lleugeres variacions en el contingut relatiu d'aquests components minoritaris respecte el total de BCl, incrementant-se en els cultius latents (controls i no crescuts). L'increment del CRHS respecte el contingut total de BCl fou del 7% i del 17% en *Chlorobium limicola* i *C. chlorovibrioides*, respectivament. Les espècies marrons van presentar un increment del CRHS menor, del 5% en *Chlorobium phaeobacteroides* i del 3% en *C. phaeovibrioides*. Assumint el possible origen degradatiu d'aquests pigments (Caple *et al.*, 1978) el contingut més baix d'homòlegs secundaris en les espècies marrons podria derivar-se del millor estat fisiològic d'aquestes espècies en condicions de limitació lumínica.

4.2.2. Variacions dels pigments antena durant el creixement de *Chlorobium phaeobacteroides* a intensitats baixes de llum

4.2.2.1. Condicions experimentals

Per la realització de l'experiment es va escollir *Chlorobium phaeobacteroides* degut a la bona adaptació d'aquesta espècie a climes lumínics baixos i a la capacitat potencial de variar el seu CRH. *Chlorobium phaeobacteroides* es van fer créixer per duplicat en tubs de vidre de 20 ml de capacitat completament plens amb medi Pfennig (Trüper i Pfennig, 1992) i tancats hermèticament amb tap de rosca. L'inòcul (volum final del 10%) es va realitzar a partir d'un cultiu actiu crescut a $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La incubació dels tubs es va realitzar a 25°C en la cambra termostatitzada descrita en l'apartat 4.2.1 i disposant els tubs de forma vertical en planxes de fusta.

La il.luminació es va subministrar de forma continuada mitjançant una bombeta fluorescent de 25 W (Philips SL-25). La intensitat de llum es va mesurar entre 300 i 900 nm amb un espectroradiòmetre LI-COR 1800-1W. Les intensitats de llum assajades foren 50; 1; 0,5 i $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i es van aconseguir col.locant les planxes amb els tubs a una distància apropiada de la font de llum. Els cultius a $0,5$ i $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van ombrejar amb tres làmines de paper blanc. L'addició de sulfhídric es va realitzar tal i com s'ha descrit en l'apartat 4.2.1. L'interval de temps entre

Taula 4.4. Contingut relatiu d'homòlegs (CRH) per les quatre espècies bacterianes estudiades sota diferents intensitats de llum. Els cultius inòcul van créixer a $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Table 4.4. Relative content of $BChl_f$ homologues (RCH) of the four bacterial species at different light intensities. The cultures that were used as inocula were grown at $\approx 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Condicions	CRH (%)															
	CL*				CC*				CP*				CPv*			
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_1	c_2	c_3	c_4	e_1	e_2	e_3	e_4	e_1	e_2	e_3	e_4
Inòcul	1,9	35,8	57,2	5,1	18,7	54,9	20,1	6,3	3,1	50,2	32,2	14,6	16,3	45,4	27,1	11,2
Control (fosc)**	1,9	34,7	57,7	5,6	16,4	54,1	22,8	6,8	2,9	48,1	31,8	17,2	14,3	43,7	28,9	13,1
$0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ **	1,9	34,2	58,1	5,8	16,6	54,6	21,8	6,7	2,9	54,9	29,6	12,5	11,9	41,9	29,8	16,5
$0,1 \mu\text{E} + \text{acetat}$	1,9	34,5	57,9	5,7	20,2	56,9	19,3	3,5	0,4	41,8	32,7	25,0	0,6	26,5	32,6	40,3

* CL: *Chlorobium limicola*; CC: *C. Chlorovibrioides*; CP: *C. phaeobacteroides*; CPv: *C. phaeovibrioides*.

** : Sense creixement (nombre de duplicacions inferior a 0,3).

** : No growth (doublings less than 0.3).

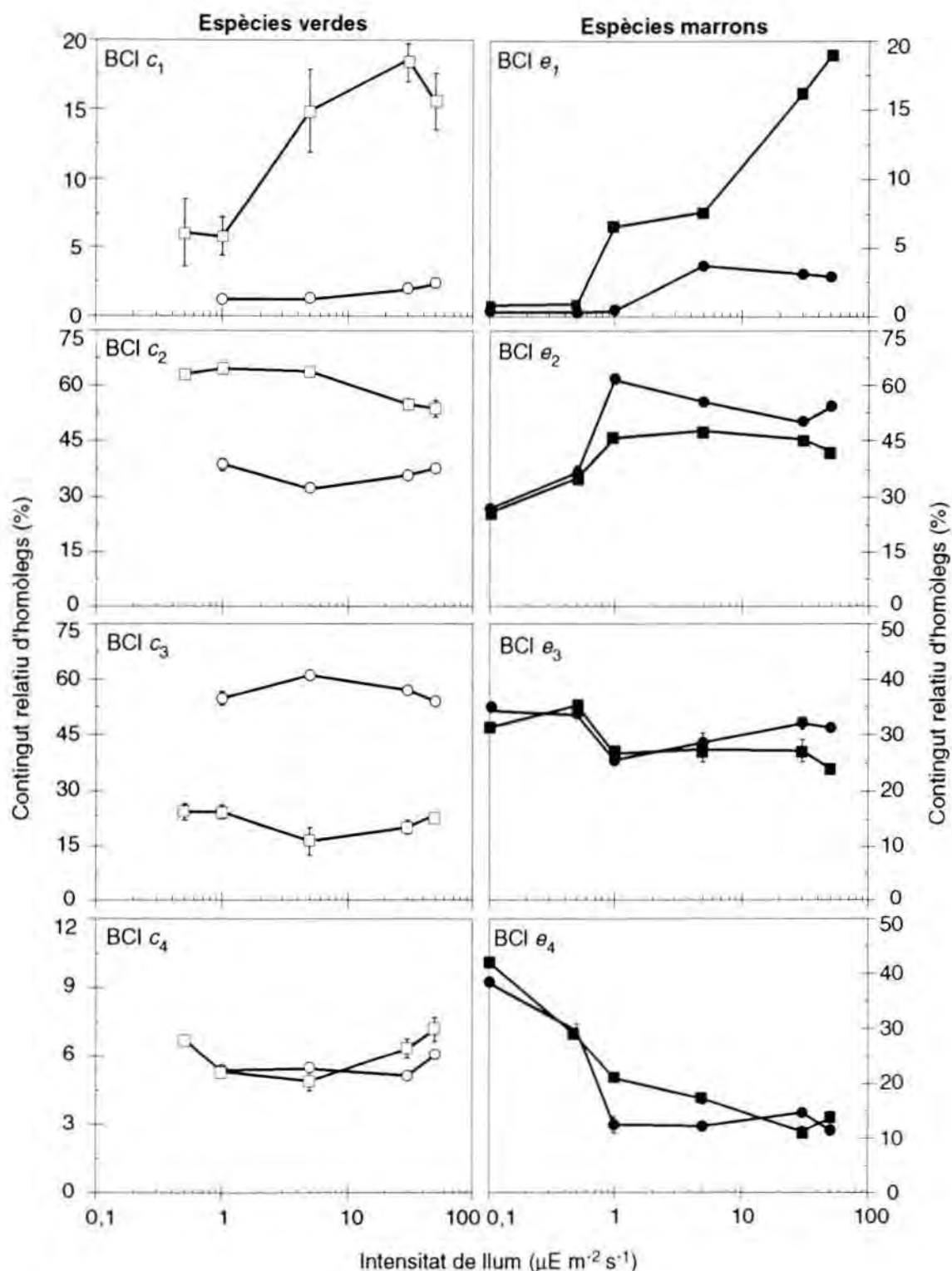


Figura 4.6. Variacions en el contingut relatiu dels quatre homòlegs principals de les bacterioclorofil·les *c* i *e* a *Chlorobium limicola* (○), *C. chlorovibrioides* (□), *C. phaeobacteroides* (●) i *C. phaeovibrioides* (■). Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 4.6. Changes in the relative content of the four main farnesyl-esterified BChl *c* and *e* homologs of *C. limicola* (○), *C. chlorovibrioides* (□), *C. phaeobacteroides* (●), and *C. phaeovibrioides* (■). Vertical bars: standard error.

cada addició depenia del consum de S^{2-} a cada intensitat de llum, variant des de les 24 h pels cultius a $50 \mu E m^{-2} s^{-1}$ fins a les 96 h pels cultius incubats a $0,1 \mu E m^{-2} s^{-1}$. Els tubs incubats a $0,1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ es van suplementar amb acetat sòdic a una concentració final de 2 mmol l^{-1} . Els controls foscos consistien en quatre tubs de cultiu protegits de la llum amb paper d'alumini i amb el mateix volum d'inòcul. En dos dels controls es va afegir acetat sòdic per tal de comprovar si aquest producte tenia algun efecte sobre la composició pigmentària.

La presa de les mostres es realitzava retirant els tubs a diferents intervals de temps durant del període de creixement bacterià. Una vegada presa la mostra se'n realitzava un espectre d'absorció *in vivo* entre 350 i 900 nm. Posteriorment, els cultius es centrifugaven i es realitzava l'extracció dels pigments i l'anàlisi de la concentració de proteïnes.

4.2.2.2. Creixement

Les corbes de creixement dels cultius sotmesos a les diferents intensitats de llum es mostren a la figura 4.7. L'increment de biomassa es representa en funció de la concentració de sulfhídric afegida ja que en cultius tancats aquest compost actúa de factor limitant pel creixement. Tots els tractaments assajats van seguir una dinàmica típica de creixement, amb diferents fases. A 50 i $1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ les cèl.lules van mostrar un creixement exponencial immediatament després de la inoculació dels cultius. Els valors de biomassa més alts es van mesurar en els cultius incubats a $50 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ($84 \text{ mg prot l}^{-1}$) mentre que en els crescuts a 1 i $0,5 \mu E m^{-2} s^{-1}$ es van mesurar valors inferiors (al voltant de $60 \text{ mg prot l}^{-1}$ en ambdós casos). A $0,1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ la concentració de biomassa fou la més baixa ($43 \text{ mg prot l}^{-1}$), evidenciant la situació de limitació lumínica en què es trobaven aquests cultius. Aquesta observació es va veure confirmada pel baix consum de S^{2-} durant el creixement dels cultius incubats a $0,1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ (12 mmol l^{-1} de S^{2-} afegit total) en comparació a les oxidades per la resta de cultius (a l'entorn dels 20 mmol l^{-1} de S^{2-} afegit total). Malgrat això, l'eficiència fotosintètica, mesurada com l'increment de biomassa respecte el total de S^{2-} consumit, dels cultius incubats a $0,1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ fou la més elevada (Figura 4.8).

4.2.2.3. Composició pigmentària

En primer lloc es volia determinar si el desplaçament cap el vermell del màxim Q_y de la BCl *e* observat prèviament en cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a baixes intensitats de llum es donava de forma gradual o bé si tenia lloc de forma puntual en una de les diferents fases del creixement. Els resultats van confirmar que el canvi de posició del màxim Q_y es realitza gradualment, desplaçant-se de forma progressiva cap a longituds d'ona menys energètiques (Taula 4.5). L'única excepció a aquesta tendència fou en el cas dels cultius incubats a $50 \mu E m^{-2} s^{-1}$, on els valors finals del màxim Q_y foren pràcticament idèntics ($721,5 \text{ nm}$) als mesurats en l'inòcul i en les primeres fases del creixement (721 nm). El desplaçament mesurat en la resta de cultius fou més accentuat com més baixa era la llum disponible pel creixement. En els cultius incubats a $1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ el màxim Q_y va experimentar un

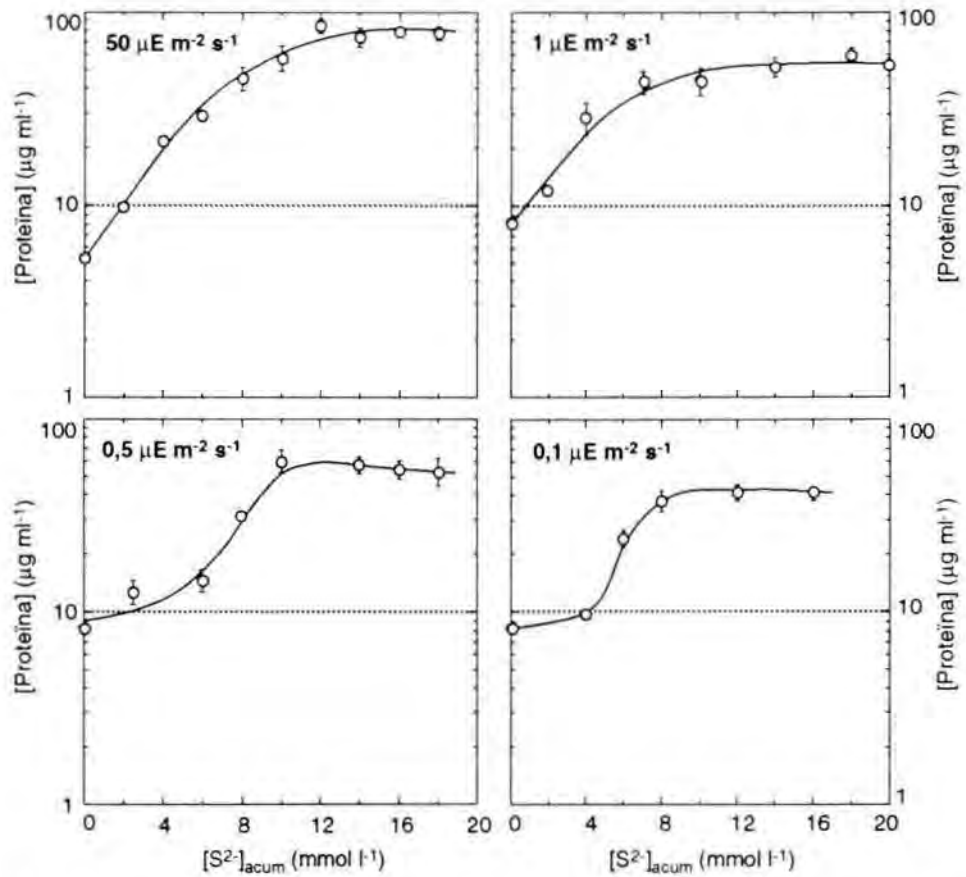


Figura 4.7. Creixement dels cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* a les diferents intensitats de llum. Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 4.7. Growth of *Chlorobium phaeobacteroides* at different light intensities. Vertical bars: standard error.

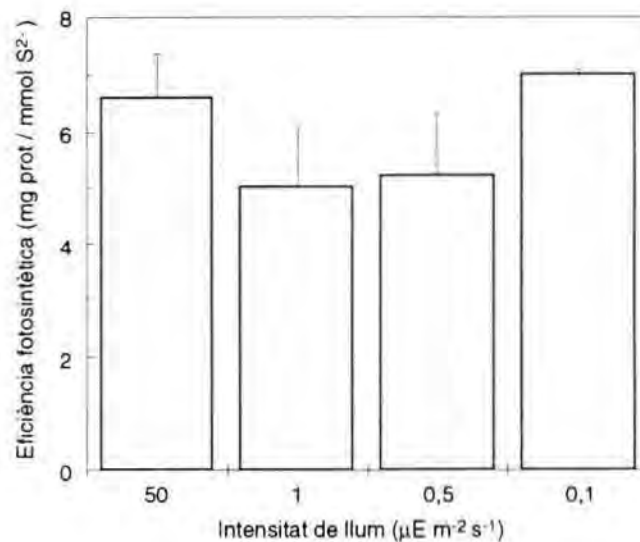


Figura 4.8. Eficiència fotosintètica (Δ Biomassa/ Δ S²⁻ consumit) dels cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a diferents intensitats de llum. Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 4.8. Photosynthetic yield (Δ Biomassa/ Δ S²⁻ consumed) of *Chlorobium phaeobacteroides* cultures at different light intensities. Vertical bars: standard error.

desplaçament cap el vermell de 2,5 nm mentre que en els crescuts a 0,5 i 0,1 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fou de 6,5 nm. A més d'aquest desplaçament, també es va detectar un lleuger augment en l'amplada de la banda associada al màxim Q_y . Atès que l'amplada d'aquesta banda sembla estar relacionada amb el nombre de components espectrals (homòlegs o agregats) dins l'antena (Mimuro *et al.*, 1989; 1994; Matsuura *et al.*, 1993), un augment en la seva amplada pot ser atribuït a un increment en el nombre d'homòlegs o un canvi en la seva composició.

Taula 4.5. Màxims d'absorció en la banda Q_y de la BCl *e* (en nanòmetres) pels cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a diferents intensitats de llum.

Table 4.5. *Bacteriochlorophyll e* Q_y absorption maxima (in nm) of *Chlorobium phaeobacteroides* cultures grown at different light intensities

S ² acum. (mmol l ⁻¹)	Intensitat de llum ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)			
	50	1	0,5	0,1
0	721,0 ± 0,0	721,5 ± 0,5	721,5 ± 0,5	721,5 ± 0,5
4	721,5 ± 0,5	722,5 ± 0,5	723,5 ± 0,5	723,5 ± 0,5
6	721,5 ± 0,5	722,5 ± 0,5	724,5 ± 0,5	724,0 ± 0,0
8	720,5 ± 0,5	723,5 ± 0,5	725,0 ± 0,0	726,0 ± 0,0
10	721,0 ± 0,0	724,0 ± 0,0	727,0 ± 1,0	727,5 ± 0,5
14	720,0 ± 0,0	724,0 ± 0,0	726,5 ± 0,5	728,0 ± 0,8
18	721,5 ± 0,5	724,0 ± 0,0	726,0 ± 0,5	
20	721,5 ± 0,0	724,0 ± 0,5		

En tots els tractaments assajats, els cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* van incrementar el contingut específic de pigments antena (Taula 4.6). El contingut específic de BCl *e* i carotenoides es va incrementar de forma anàloga fins i tot en condicions crítiques de llum ($< 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). D'altra banda, el contingut específic de BCl *a* no va seguir la pauta marcada per la BCl *e* i els carotenoides, sinó que es va mantenir aproximadament constant en els diferents tractaments.

4.2.2.4. Anàlisi cromatogràfica

Durant el creixement de *Chlorobium phaeobacteroides* a intensitats de llum baixes es van produir forts canvis en el contingut relatiu dels quatre homòlegs principals de la bacterioclorofil·la *e* –BCl_F*e*– (Taula 4.7). Excepte els cultius incubats a 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en la resta de tractaments es va mesurar un increment en el contingut del tercer i quart homòlegs de la BCl *e* –BCl_F*e*₃ i BCl_F*e*₄– (Figura 4.9) que va anar acompanyat, a més, de la pràctica desaparició de BCl_F*e*₁ i d'una disminució en el contingut de BCl_F*e*₂. Aquest enriquiment de l'antena en homòlegs més alquilats es va donar de forma progressiva durant el creixement, sense que s'observessin

Taula 4.6. Continguts específics dels diferents pigments i proporcions entre aquests pels cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a diferents intensitats de llum. Els cultius a $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es van suplementar amb acetat sòdic (concentració final de 2 mmol l^{-1}).

Table 4.6. Specific pigment contents and pigment ratios for the *Chlorobium phaeobacteroides* cultures grown at different light intensities. Cultures placed at $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were supplemented with sodium acetate (final concentration of 2 mmol l^{-1}).

Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Fase	[BChl c] _{esp} ($\mu\text{g BChl mg prot}^{-1}$)	[BChl a] _{esp} ($\mu\text{g BChl mg prot}^{-1}$)	[Isr] _{esp} ($\mu\text{g Isr mg prot}^{-1}$)	BChl e: BChl a	Isr: BChl e
50	inicial	138,5	7,2	54,3	19,2	0,38
	final	137,5	30,2	56,9	4,5	0,42
1	inicial	99,1	4,6	38,5	1,5	0,38
	final	248,8	18,2	92,6	13,7	0,37
0,5	inicial	99,1	4,6	38,5	1,5	0,38
	final	329,1	19,5	111,4	16,9	0,34
0,1	inicial	99,1	4,6	38,5	1,5	0,38
	final	426,6	30,2	153,0	14,1	0,36

Taula 4.7. Contingut relatiu dels quatre homòlegs principals de la BChl e en els cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* al final del creixement. El cultiu inoculat va créixer a $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Table 4.7. Relative content of the main BChl_F e homologs of *Chlorobium phaeobacteroides* cultures at the end of the growth period. The culture used as inoculum was grown at $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Condicions	CRH (%)			
	e_1	e_2	e_3	e_4
Inòcul	0,8	42,4	31,2	25,6
Control (fosc)*	0,9	41,0	29,7	28,4
Control (fosc)+ acetat*	0,9	41,1	29,7	28,3
Inicial tractaments	0,7	45,7	30,2	23,4
$50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,6	42,1	31,1	26,2
$1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,4	40,2	28,9	30,5
$0,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,05	28,6	36,2	35,1
$0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0,03	27,7	31,7	40,6

* : Sense creixement. No es van mesurar diferències en el CRH respecte els valors inicials mesurats en aquests cultius.

* : When no growth was detected no re-arrangement of homologues was measured.

diferències significatives entre la fase exponencial i l'estacionària. D'altra banda, la manca de canvis en el CRH en els cultius control demostra tant l'impossibilitat per part de *C. phaeobacteroides* de modificar el CRH en absència de creixement com l'efecte nul de l'acetat en aquests canvis (Taula 4.7).

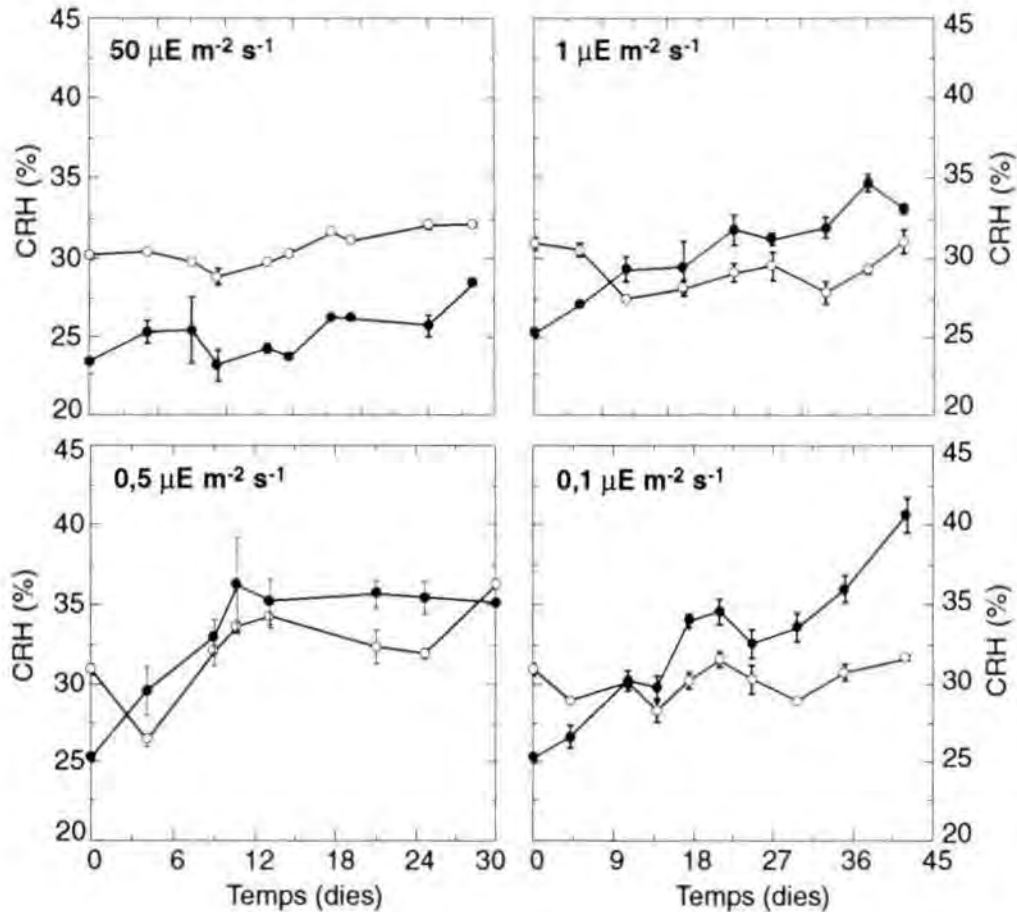


Figura 4.9. Variacions en el contingut relatiu de $BChl e_3$ (○) i $BChl e_4$ (●) homòlegs de la $BChl e$ als cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a les diferents intensitats de llum. Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 4.9. Changes in the relative content of the $BChl e_3$ (○) and $BChl e_4$ (●) in *Chlorobium phaeobacteroides* cultures at different light intensities tested. Vertical bars: standard error.

Malgrat que les proporcions relatives entre els diferents homòlegs secundaris no van mostrar variacions significatives, el CRHS sí es va incrementar respecte el total de $BChl e$. L'increment més aparent es va mesurar en la fase estacionària (Figura 4.10) tot i que durant el creixement es va poder observar un augment progressiu en la importància relativa d'aquests pigments minoritaris. El CRHS va augmentar considerablement en els cultius incubats a 50 i $1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ passant de representar un 18% a un 47% i d'un 9% a un 40% del total de $BChl e$, respectivament. En la resta de cultius, la concentració relativa màxima fou sempre inferior (25-30%).

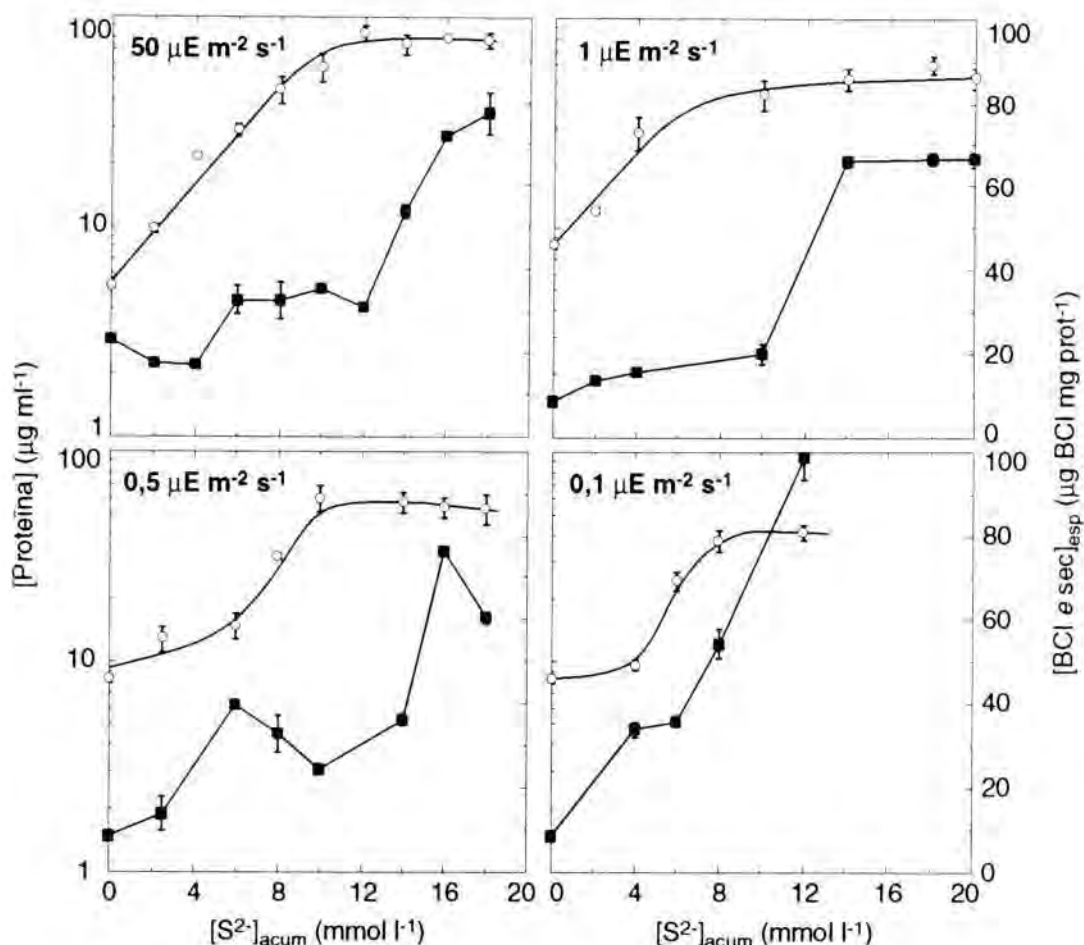


Figura 4.10. Variacions en la biomassa (○) i el contingut relatiu d'homòlegs secundaris de la BChl e (■) als cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a les diferents intensitats de llum. Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 4.10. Variations in the biomass (○) and the relative content of secondary BChl e homologs (■) in *Chlorobium phaeobacteroides* cultures at different light intensities tested. Vertical bars: standard error.

4.2.3. Fotoadaptació de l'aparell fotosintètic de *Chlorobium tepidum*

Coneguda la resposta adaptativa a nivell cel·lular de les espècies verdes i marrons dels bacteris verds del sofre al creixement a baixes intensitats de llum, l'objectiu principal dels estudis que es presenten en aquest apartat fou esbrinar el paper específic dels diferents elements sub-cel·lulars fotosintètics –clorosomes i complexos antena associats a membranes– en el procés global d'adaptació lumínica.

4.2.3.1. Condicions experimentals

Es van fer créixer cultius tancats (*batch*) de *Chlorobium tepidum* sota TLS (ATCC 49652) en una cambra termostatitzada de metacrilat a 45°C, per duplicat i en ampolles planes de vidre de 1,150 litres. El medi utilitzat pel creixement fou el descrit per Wahlund et al. (1991) afegint-s'hi 500 μl l⁻¹ de resazurina (SIGMA

Chemicals) com a indicador del potencial redox. Cadascuna de les ampolles de cultiu eren inoculades amb 40 ml (volum final d'inòcul del 3,5 %) provinents d'un cultiu en continu de *C. tepidum* creixent a una taxa de $0,14 \text{ h}^{-1}$ i a una intensitat de llum de $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La il·luminació es va subministrar mitjançant un tub fluorescent (OSRAM, 83W) emplaçat a l'exterior de la cambra de cultiu. La intensitat de llum es va mesurar entre 300 i 900 nm amb un espectroradiòmetre LI-COR 1800-11. Les intensitats de llum estudiades foren $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (HL); $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ML); $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LL) i $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (CL). Les diferents intensitats de llum es van aconseguir variant la distància de les ampolles de cultiu a la font de llum i ombrejant-les amb paper de filtre blanc. Els cultius HL es van col·locar a 5 cm del tub fluorescent. Els cultius ML es van col·locar a 15 cm de la font de llum i es van ombrer amb una làmina de paper. Finalment, els cultius LL i CL es van col·locar a 35 cm i es van ombrer amb una i tres làmines de paper de filtres, respectivament. Degut a les dificultats de les espècies verdes per créixer a intensitats de llum crítiques ($<1 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; veure apartat 4.2.1), no es van considerar per aquest experiment les intensitats inferiors a aquest valor.

4.2.3.2. Creixement

Per tal de comprovar l'efecte de la intensitat de llum sobre el creixement fotosintètic es varen incubar cultius a 450, 50, 35, 10, 5, 1 i $0,7 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Com a resposta a la variació de la intensitat de llum disponible *Chlorobium tepidum* va modificar la seva taxa de creixement, mostrant una corba hiperbòlica de saturació a mida que la intensitat de llum augmentava (Figura 4.11). Pels propòsits experimentals, es van escollir aquelles intensitats de llum que representaven un interval més adequat dins el rang fisiològic que es pretenia investigar (es a dir 50, 10, 5 i $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Tant a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com a intensitats superiors el creixement va mostrar una clara saturació. Per la seva banda, els cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a intensitats de llum inferiors a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ van presentar un creixement insuficient i es van descartar.

La taula 4.8 recull els principals paràmetres de creixement calculats en els cultius incubats a les diferents intensitats investigades així com el rendiment global del creixement mesurat com el contingut de proteïna total al final del període de creixement. La màxima biomassa es va mesurar en els cultius HL ($209,7 \pm 3,2 \text{ mg prot l}^{-1}$) mentre que en els cultius ML i LL els valors obtinguts foren inferiors ($53,3 \pm 5,3$ i $67,6 \pm 0,4 \text{ mg prot l}^{-1}$, respectivament). Els cultius CL (incubats a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) van mostrar els valors de biomassa més baixos ($26,9 \pm 2,4 \text{ mg prot l}^{-1}$) malgrat que el seu temps d'incubació fou superior (120 h). Això confirma les observacions esmentades en l'apartat 4.2.1 i 4.2.2 que fan referència a les diferències d'adaptació lumínica entre les espècies verdes i marrons dels bacteris verds del sofre.

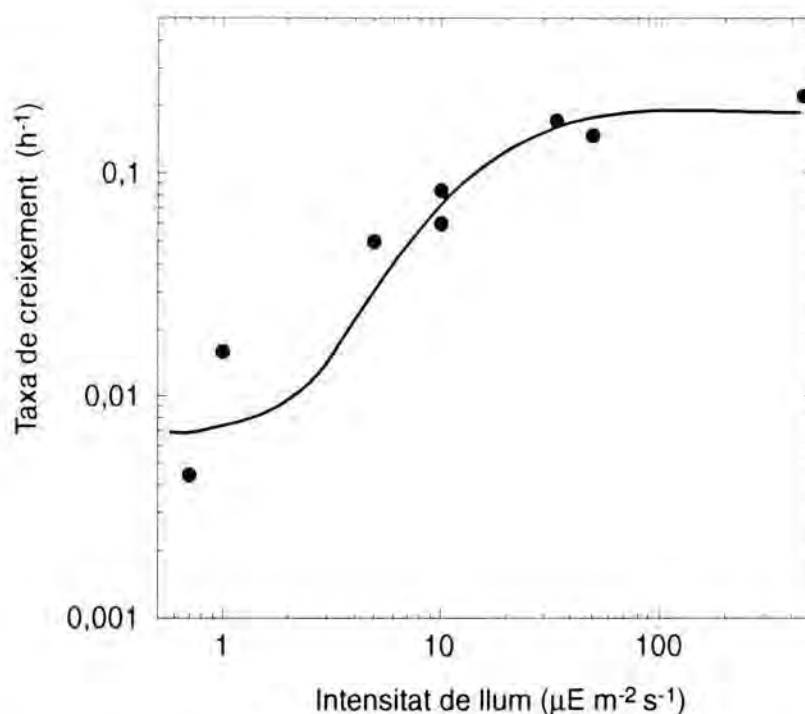


Figura 4.11. Efecte de la intensitat de llum en la taxa de creixement de *Chlorobium tepidum*. La corba mostra el millor ajust a una funció hiperbòlica tot i que no es pot distingir entre aquesta i d'altres funcions similars.

Figure 4.11. Effect of light intensity on the growth rate of *Chlorobium tepidum*. The curve shows the best fit to a hyperbolic function although it was not possible to distinguish between this and other functions with a similar shape.

Taula 4.8. Principals paràmetres de creixement i concentracions finals de proteïna calculades pels cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum.

Table 4.8. Main growth parameters and final protein concentrations measured in *Chlorobium tepidum* grown at different light intensities.

Condicions ^a	Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	μ (h^{-1})	t_g^b (h)	Incubació (h)	[Proteïna] (mg l^{-1})
HL	50	0,147	4,7	30	209,7 ± 3,2
ML	10	0,084	8,2	30	53,3 ± 5,3
LL	5	0,050	13,8	50	67,6 ± 0,4
CL	1	0,016	43,3	120	26,9 ± 2,4

^a: HL: Intensitat de llum alta; ML: Intensitat mitja; LL: Intensitat baixa; CL: Intensitat crítica.

^b: t_g : Temps de generació.

^a: HighLight; ML: Medium Light; LL: Low Light; CL: Critical Light.

^b: t_g : Duplication time.

4.2.3.3. Aïllament de fraccions sub-cel.lulars fotosintètiques

Els clorosomes i les fraccions enriquides amb membranes fotosintètiques es van obtenir a partir d'aquelles cèl.lules que van mostrar les diferències extremes en quant a composició pigmentària, és a dir, les cèl.lules HL, LL i CL.

La separació dels clorosomes i les membranes a partir de les cèl.lules de *Chlorobium tepidum* es va aconseguir mitjançant ultracentrifugació amb gradient de densitat (veure apartat 2.4.2). Una vegada centrifugats, els gradients van donar lloc a patrons de bandes similars pels tres tipus de cèl.lules. Els clorosomes es van concentrar en una única banda de color verd fosc amb una densitat corresponent al 29-34% de sacarosa (Figura 4.12). Pels tres tipus de cèl.lules fraccionades, les membranes fotosintètiques es van enriquir entre el 36 i el 42% de sacarosa. Donat que durant el fraccionament cel.lular no es van utilitzar ni detergents ni agents caotròpics, les fraccions membranoses també contien clorosomes en baixes quantitats.

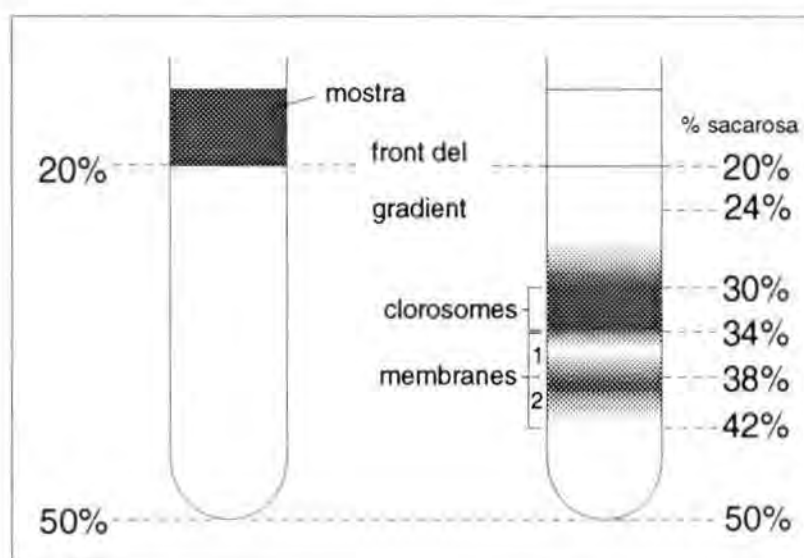


Figura 4.12. Representació esquemàtica de la distribució en bandes de les fraccions enriquides en clorosomes i membranes fotosintètiques (distribuïdes en dues bandes, 1 i 2) de *Chlorobium tepidum* després de l'aïllament per centrifugació amb gradients de sacarosa.

Figure 4.12. Eschematic view of the banding pattern for the chlorosome and photosynthetic membrane-enriched fractions (1 and 2) of *Chlorobium tepidum* after the isolation by sucrose density gradient centrifugation.

4.2.3.4. Composició pigmentària

La segona resposta de *Chlorobium tepidum* al creixement a baixes intensitats lumíniques fou l'adaptació qualitativa i quantitativa dels seus pigments fotosintètics. La primera evidència d'aquesta adaptació fou un desplaçament cap el vermell en la posició del màxim Q_y de la BCl *c* en els espectres d'absorció *in vivo* dels cultius crecuts a intensitats de llum baixes respecte d'aquells mesurats en els

cultius incubats a intensitats altes de 10 i 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4.13). Aquest desplaçament gradual fou similar a l'observat en altres espècies de *Chlorobium* sota condicions experimentals similars (veure apartats 4.2.1.3 i 4.2.2.3). El màxim Q_y va passar de 752 nm en les cèl.lules HL a 755,5 nm per les ML, 758 nm per les LL i 760 nm per les cèl.lules CL (Taula 4.9). A més d'aquest desplaçament cap el vermell, l'amplada de la pròpia banda Q_y es va veure afectada per la intensitat de llum, variant des de 65 nm per les cèl.lules HL a 67 nm per les CL.

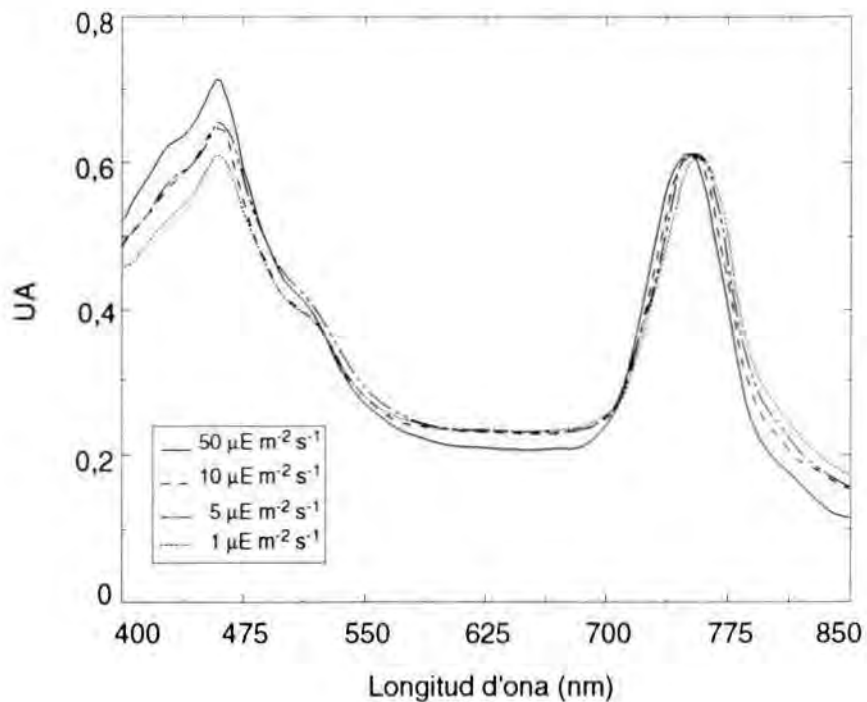


Figura 4.13. Espectre d'absorció *in vivo* dels cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum. Els espectres es van normalitzar pel seu màxim Q_y .

Figure 4.13. *In vivo* absorption spectra of *Chlorobium tepidum* cultures at different light intensities. Spectra were normalized at the Q_y maximum.

Els clorosomes van mostrar també un desplaçament cap el vermell del seu màxim Q_y similar al que s'havia detectat en les cèl.lules *in vivo*. Aquest desplaçament fou tant o més aparent com més baixa era la intensitat de llum (Figura 4.14.A). En aquest cas, el màxim Q_y de la BCl *c* va variar des de 746,5 nm per les cèl.lules HL fins a 751,5 nm per les CL. Un desplaçament similar van mostrar els clorosomes associats a les membranes fotosintètiques (Figura 4.14.B) tot i que en aquestes mostres, la localització del pic a 809 nm atribuït a la BCl *a* –present a les proteïna FMO– es va mantenir constant en els tres tipus de cèl.lules.

Els espectres d'absorció *in vivo* de les cèl.lules i fraccions fotosintètiques mostrats en les figures 4.13 i 4.14 revelen també un augment en el contingut total de carotenoides en les cèl.lules crescudes a 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL). Aquesta observació, deduida de l'alçada del pic a 454 nm i de la prominència a 505 nm, va suggerir

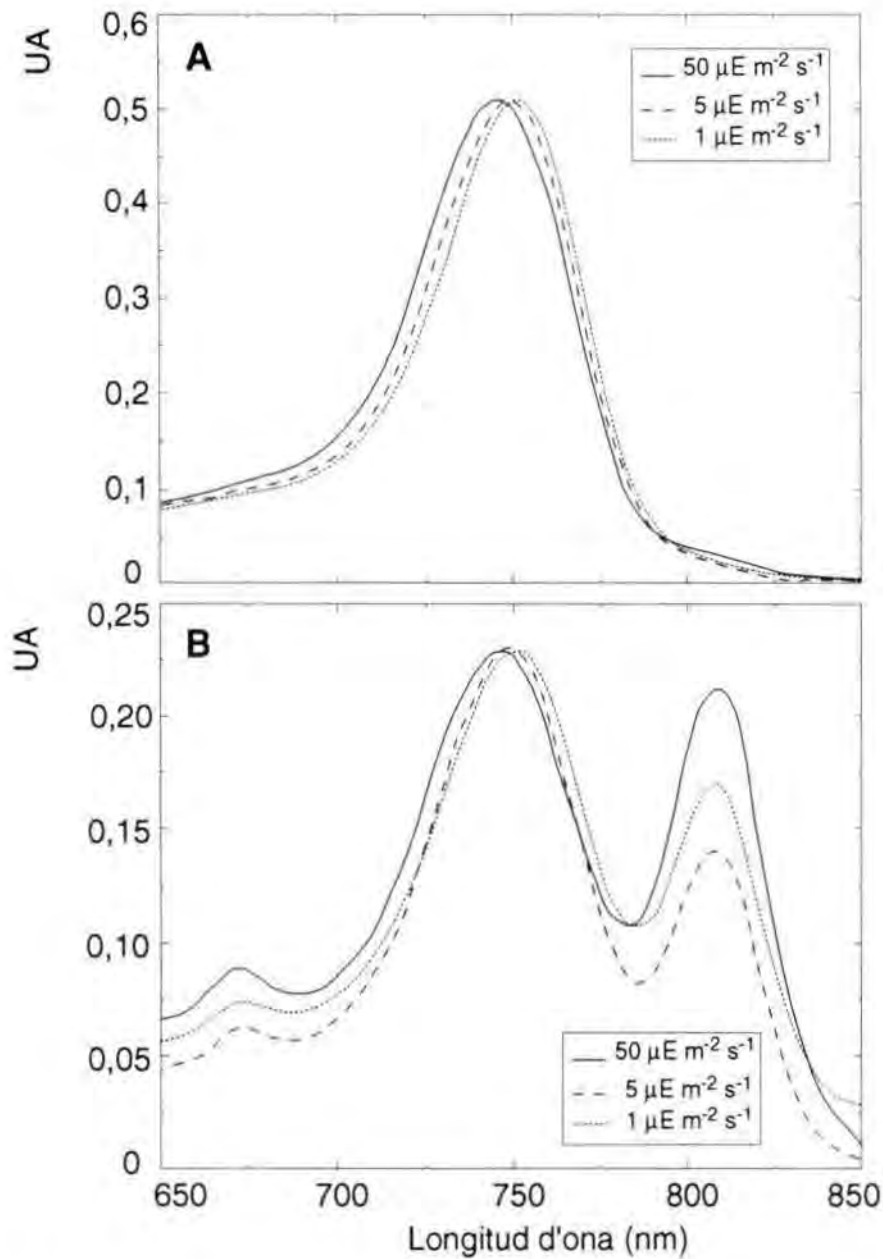


Figura 4.14. Espectre d'absorció *in vivo* de (A) els clorosomes i (B) de les fraccions enriquides en membranes aïllades dels cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum. Els espectres es van normalitzar pel seu màxim Q_y .

Figure 4.14. *In vivo* absorption spectra of (A) chlorosomes fractions and (B) membrane-enriched fractions isolated from *Chlorobium tepidum* cultures at different light intensities. Spectra were normalized at the Q_y maximum.

l'existència d'un canvi en la composició de l'antena de *Chlorobium tepidum* per tal de fer front al creixement a les baixes intensitats de llum. El càlcul de les concentracions de pigments en els diferents tractaments va revelar un increment generalitzat dels continguts específics de pigments antena (BChl *c* i carotenoides) que va constituir la principal adaptació de les cèl·lules davant condicions de limitació lumínica (Taula 4.10). El contingut específic de BChl *a*, en canvi, es va mantenir pràcticament constant en tots els tractaments (5–7 $\mu\text{g BChl a mg prot}^{-1}$),

Taula 4.9. Màxims d'absorció Q_y , amplades de la banda Q_y i màxim de l'emissió de fluorescència en els cultius *in vivo* i les diferents fraccions fotosintètiques aïllades de *Chlorobium tepidum*. La longitud d'ona d'excitació en els espectres de fluorescència es va fixar en cada mostra en el seu màxim d'absorció corresponent (Q_y).

Table 4.9. Q_y absorption maxima, Q_y bandwidths, and fluorescence emission maxima in the whole cells and isolated photosynthetic fractions of *Chlorobium tepidum*, at different light intensities. The fluorescence excitation wavelength was set at the correspondant Q_y maximum of each sample.

Mostra ^a	Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Q_y (nm)	Amplada Q_y (nm)	Màxim emissió fluor. (nm)
Cèl.lules				
HL	50	752,0	65	–
ML	10	755,5	66	–
LL	5	758,0	67	–
CL	1	759,5	67,5	–
Clorosomes				
HL	50	746,5	63	773
LL	5	750,0	64	776
CL	1	751,5	64	777
Membranes				
HL	50	747,5	61	770
LL	5	749,0	63	772
CL	1	751,0	63	774

^a: HL: Intensitat de llum alta; ML: Intensitat mitja; LL: Intensitat baixa; CL: Intensitat crítica.

^a: HighLight; ML: Medium Light; LL: Low Light; CL: Critical Light.

Taula 4.10. Continguts específics de pigments i proporcions entre aquests pels cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum.

Table 4.10. Specific pigment content and pigment ratios for *Chlorobium tepidum* grown at different light intensities.

Condicions ^a	[Bcl c] _{esp} ($\mu\text{g BCl mg prot}^{-1}$)	[Bcl a] _{esp} ($\mu\text{g BCl mg prot}^{-1}$)	[Cbt] _{esp} ($\mu\text{g Cbt mg prot}^{-1}$)	Bcl c:Bcl a	Car:Bcl c
HL	171 ± 12	6,3 ± 0,8	11,9 ± 0,5	27,4 ± 1,6	0,07 ± 0,002
ML	189 ± 8	5,4 ± 0,1	16,5 ± 1,3	33,1 ± 2,2	0,08 ± 0,002
LL	245 ± 10	7,0 ± 0,1	19,8 ± 0,9	34,7 ± 1,6	0,08 ± 0,001
CL	341 ± 12	7,4 ± 0,7	22,1 ± 1,1	46,3 ± 5,9	0,06 ± 0,001

^a: HL: Intensitat de llum alta; ML: Intensitat mitja; LL: Intensitat baixa; CL: Intensitat crítica.

^a: HighLight; ML: Medium Light; LL: Low Light; CL: Critical Light.

4.2.3.5. Anàlisi fluorimètrica

Les anàlisis de fluorescència a temperatura ambient es van dur a terme per tal de comprovar si el pic d'emissió de la BCl *c* dels clorosomes aïllats de les cèl.lules crescudes a les diferents intensitats de llum mostrava un desplaçament cap al vermell similar a l'observat en els espectres d'absorció. La figura 4.15 mostra els espectres d'emissió dels clorosomes aïllats (A) i dels clorosomes units a membrana (B). En ambdós casos, el pic d'emissió de la BCl *c* en els clorosomes de les cèl.lules crescudes a intensitats baixes de llum (LL i CL) va mostrar un desplaçament cap el vermell de 4 nm respecte dels clorosomes de les cèl.lules HL. La fluorescència a 820 nm, atribuïble a les proteïnes FMO, és clarament visible en les fraccions membranoses derivades de les cèl.lules HL, les quals presentaven la proporció BCl *a*:BCl *c* més elevada.

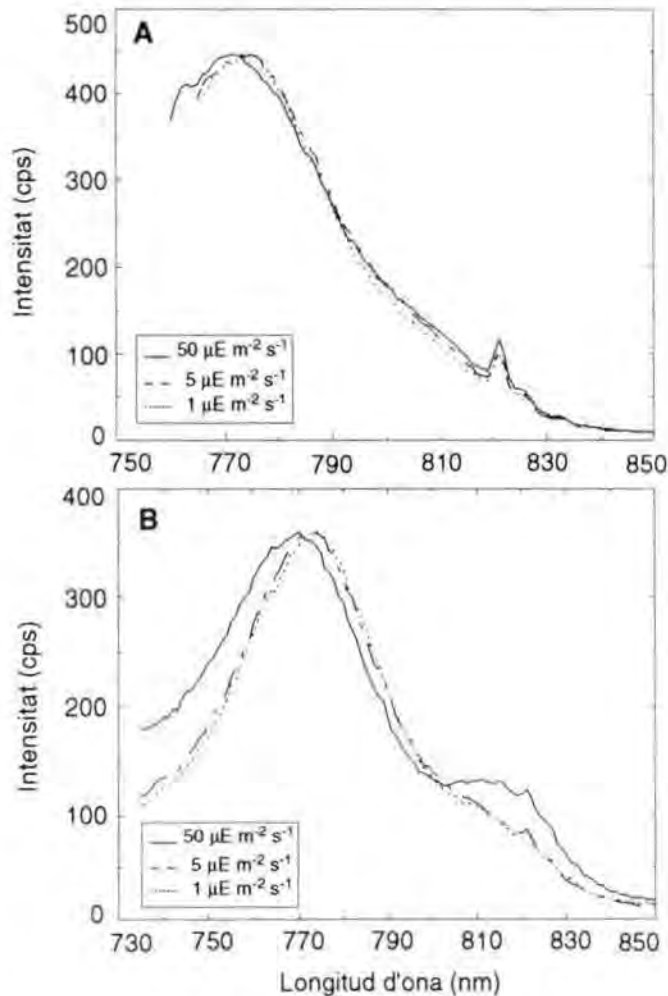


Figura 4.15. Espectre d'emissió de fluorescència de (A) els clorosomes i (B) les fraccions enriquides en membranes aïllades dels cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum. Els espectres es van normalitzar pel seu màxim Q_y . L'excitació es va fixar a la longitud d'ona corresponent al màxim Q_y de cada mostra.

Figure 4.15. Fluorescence emission spectra of (A) chlorosomes fractions and (B) membrane-enriched fractions isolated from *Chlorobium tepidum* cultures at different light intensities. Spectra were normalized at the Q_y maximum. Excitation wavelength was set at the correspondent Q_y maximum of each sample.

4.2.3.6. Anàlisi cromatogràfica

Per tal de determinar si el canvi espectral observat resultava o no d'una variació en la distribució dels homòlegs de la BCl *c*, els extractes pigmentaris obtinguts a partir dels quatre tipus de cèl.lules així com de les fraccions sub-cel.lulars es van analitzar amb HPLC. Els cromatogrames mostren els quatre pics principals corresponents als quatre homòlegs de la BCl *c* esterificats amb farnesil (BCl *c_F*) (Figura 4.16). Aquesta distribució coincideix amb l'obtinguda en *Chlorobium tepidum* per altres autors (Nozawa *et al.*, 1991a; 1993). Els quatre homòlegs es van nomenar en base al seu temps de retenció i a la nomenclatura emprada al capítol 3 com BCl *c₁* ($T_r = 27,0$ min); BCl *c₂* ($T_r = 28,9$ min); BCl *c₃* ($T_r = 30,1$ min) i BCl *c₄* ($T_r = 31,0$ min). Durant la carrera es van eluir diversos components minoritaris (min 15-20) que es van identificar com els homòlegs secundaris de la BCl *c* en base al seu espectre d'absorció –idèntic al dels homòlegs principals– i a treballs previs realitzats en *C. tepidum* (Nozawa *et al.*, 1991a).

Els carotenoides van eluir en forma de dos pics, poc resolts, al final de la carrera. El primer pic (Cbt₁, T_r de 53,5 min), estava format per dos sub-pics solapats que es van identificar com a isomers del clorobactè (Wahlund *et al.*, 1991), mentre que el segon pic (Cbt₂, T_r de 56,4 min) no es va identificar tot i que, atès que el seu espectre d'absorció (amb màxims a 434, 463 i 492 nm) era idèntic al dels pics principals, es va considerar com una forma derivada del clorobactè. Un tret interessant fou l'increment d'aquest derivat no identificat en els cultius incubats a intensitats baixes de llum (1 i $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tant en les cèl.lules senceres com en les diferents fraccions fotosintètiques aïllades (Figura 4.16 i taula 4.11).

A més de l'augment en pigments antena, es va observar un canvi composicional pel que fa el contingut d'homòlegs de la BCl *c*. El CRH va variar tant en les cèl.lules senceres com els clorosomes aïllats i els associats a membranes (Figura 4.17). En totes aquestes fraccions, el contingut del primer i segon homòlegs (BCl *c₁* i BCl *c₂*) va disminuir mentre que les proporcions de BCl *c₃* i BCl *c₄* van augmentar en aquells cultius incubats a intensitats baixes de llum. Malgrat aquesta variació, el re-arranjament d'homòlegs no fou tant evident com en el cas de les espècies marrons ja que BCl *c₄* no va representar en cap dels casos més d'un 10% del total de BCl *c*. El canvi composicional de l'antena es pot relacionar amb el canvis espectrals (desplaçament del màxim Q_y i augment de l'amplada de la banda) esmentats anteriorment. El contingut relatiu en homòlegs secundaris, en canvi, no va observar variacions destacables en cap de les mostres analitzades, tot i que en els cultius incubats a 1 i $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ els pics corresponents a aquests pigments minoritaris són lleugerament més distingibles (Figura 4.16).

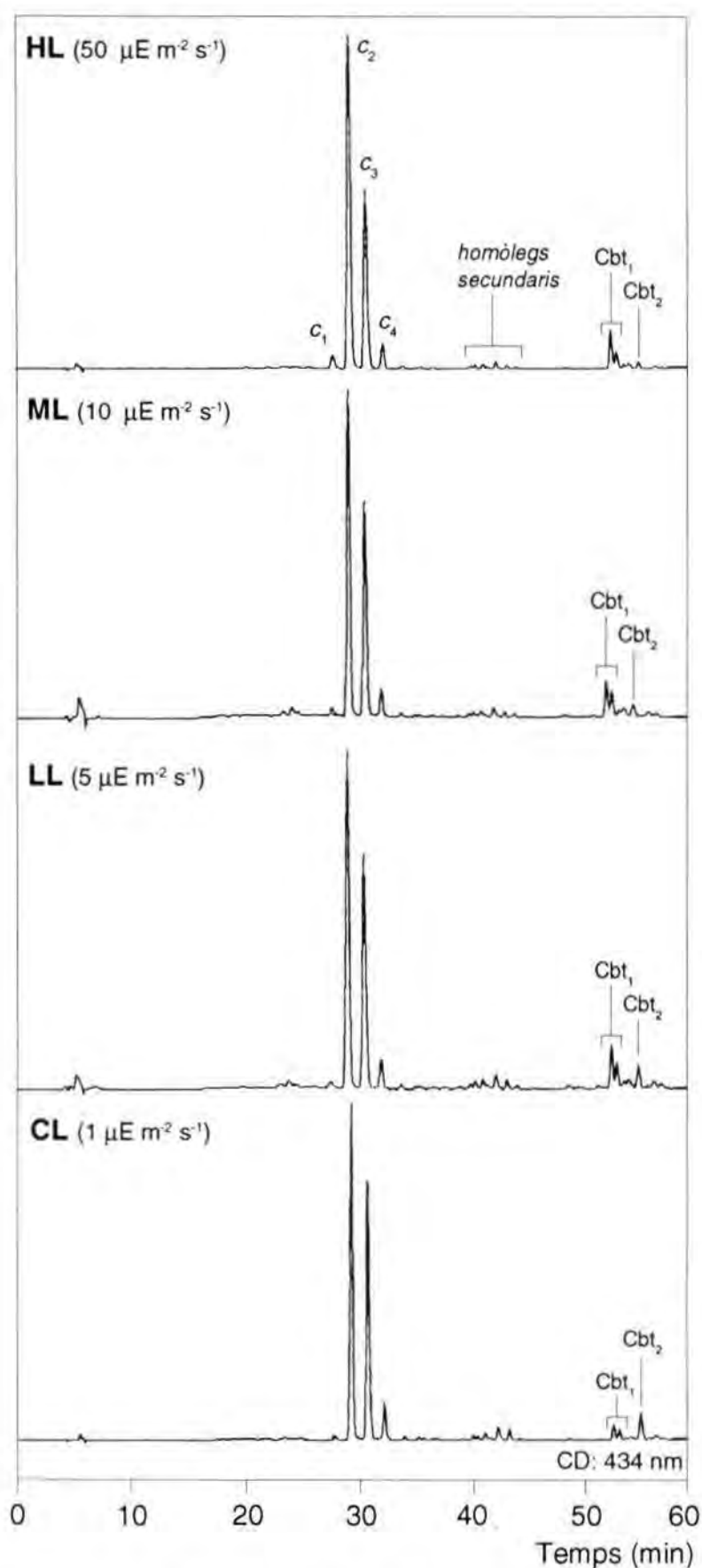


Figura 4.16. Cromatogrames dels extractes pigmentaris dels cultius de *Chlorobium tepidum* a diferents condicions de llum.

Figure 4.16. HPLC pigment traces of *Chlorobium tepidum* cultures incubated at the different light intensities tested.

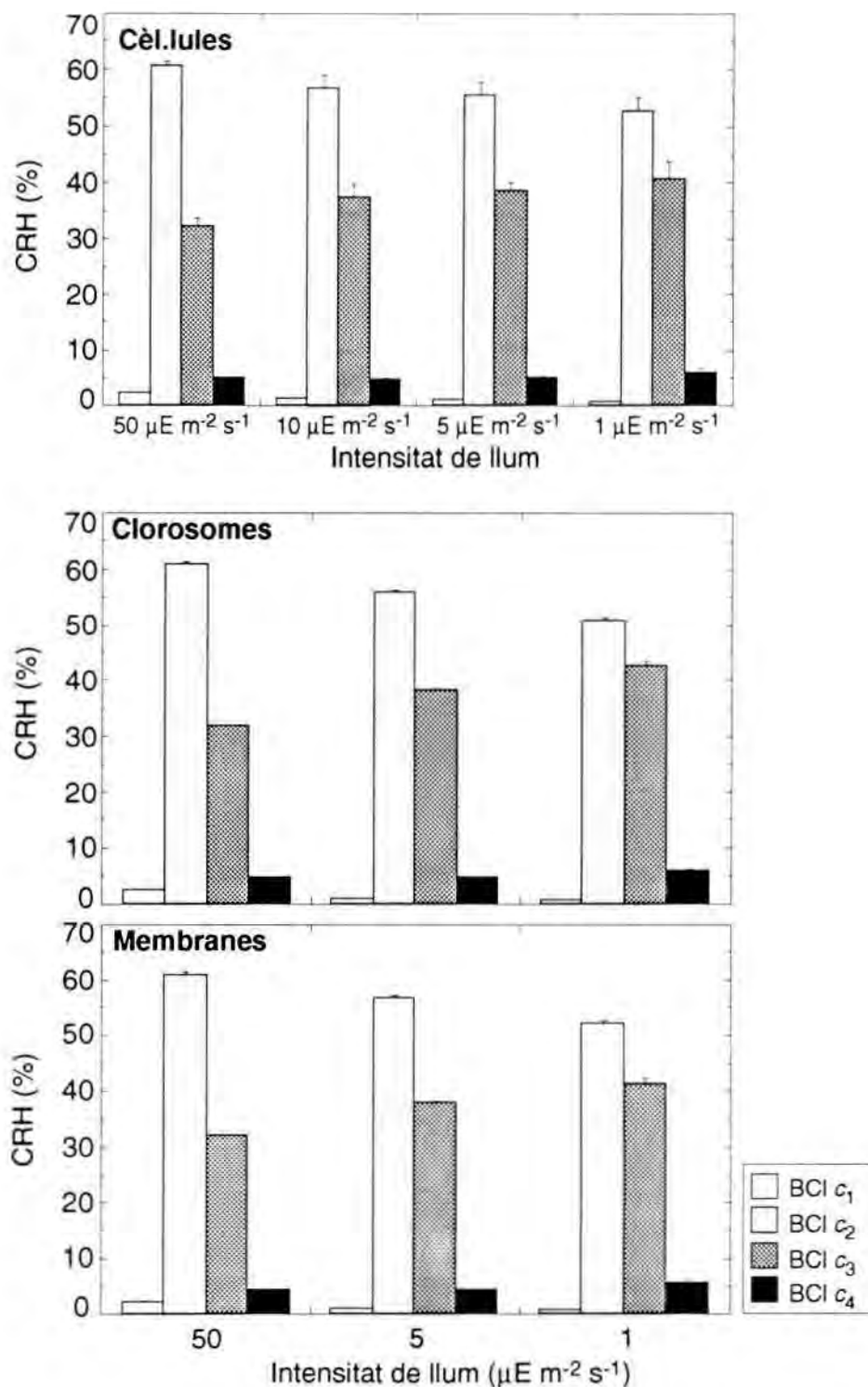


Figura 4.17. Variacions en el contingut relatiu dels quatre homòlegs principals de la BChl *c* en les cèl.lules i les diferents fraccions fotosintètiques aïllades dels cultius de *Chlorobium tepidum* a diferents intensitats de llum. Les barres verticals mostren l'error estàndard.

Figure 4.17. Changes in the relative content of four main BChl *c* homologs in the cells and the different photosynthetic fractions isolated from the *Chlorobium tepidum* cultures incubated at different light conditions. Vertical bars: standard error.

Taula 4.11. Composició en carotenoides de les cèl.lules i les fraccions fotosintètiques dels cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum. Relació entre les àrees a 462 nm sota el pic corresponent al clorobactè (Cbt₁, que conté els isomers cis- i trans-) i sota el pic corresponent al carotenoide no identificat (Cbt₂).

Table 4.11. Carotenoid composition of whole cells and photosynthetic fractions of *Chlorobium tepidum* cultures incubated at different light intensities. Relationship between the areas at 462 nm under the chlorobactene peak (Cbt₁, containing the trans and cis-isomers) and the unidentified carotenoid peak (Cbt₂).

Mostra ^a	Intensitat ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Cbt ₁ /Cbt ₂
Cèl.lules		
HL	50	4,51
ML	10	2,95
LL	5	2,12
CL	1	0,74
Clorosomes		
HL	50	3,79
LL	5	2,61
CL	1	0,77
Membranes		
HL	50	5,33
LL	5	2,90
CL	1	1,48

^a: HL: Intensitat de llum alta; ML: Intensitat mitja; LL: Intensitat baixa; CL: Intensitat crítica.

^a: HighLight; ML: Medium Light; LL: Low Light; CL: Critical Light.

4.3. DISCUSSIÓ

L'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum ha estat un tema sobre el que s'han centrat un bon nombre d'estudis, investigant la resposta global de la cèl.lula davant situacions de limitació lumínica (Cohen-Bazire, 1963; Parkin i Brock, 1980a; b; Montesinos *et al.*, 1983; Overmann *et al.*, 1992). La complexitat de l'aparell fotosintètic d'aquests bacteris fa difícil descriure la fotoadaptació com un procés global, sinó més aviat com una fina regulació dels diferents elements de l'antena fotosintètica per respondre òptimament davant les condicions lumíniques limitants. És per aquest motiu que la visió generalista dels primers treballs ha estat substituïda per una aproximació a l'efecte de les baixes intensitats de llum sobre els diferents components de l'aparell fotosintètic (clorosomes, membranes, centres de reacció), tant dels bacteris verds del sofre (Holt *et al.*, 1966; Brock-Due *et al.*, 1978; Schmidt, 1980; Fuhrmann *et al.*, 1993) com dels bacteris verds filamentosos (Schmidt *et al.*, 1980; Sprague *et al.*, 1981; Feick *et al.*, 1982; Fuller i Redlinger, 1985; Golecki i Oelze, 1987; Foidl *et al.*, 1994). Malgrat això, no ha estat fins darrerament que la contribució específica dels diferents homòlegs de les bacterioclorofil·les en el procés de fotoadaptació no ha estat considerada seriament (Bobe *et al.*, 1990; Huster i Smith, 1990; Larsen *et al.*, 1994).

4.3.1. Fotoadaptació quantitativa: increment del contingut específic de pigments antena

En microorganismes fotosintètics, l'augment del contingut específic de pigments antena com a resposta a les baixes intensitats de llum és un fenomen conegut des de fa temps, tot i que la magnitud d'aquest increment depèn del tipus de microorganisme estudiat (Larsen, 1953; Cohen-Bazire, 1963, Broch-Due *et al.*; 1978; Montesinos i van Gernerden, 1986). Aquesta resposta quantitativa, que en el cas dels bacteris verds del sofre és comuna tant en les espècies verdes com en les marrons, constituiria el principal mecanisme per fer front a una situació de limitació lumínica i repercutiria en un augment de l'eficiència fotosintètica (van Gernerden i Mas, 1995). No obstant, la disminució del contingut específic de BCl i carotenoides a intensitats de llum per sota $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ detectada en els cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides* constitueix un fenomen destacable que sembla estar relacionat tant amb l'origen de les soques estudiades com amb les condicions de creixement dels cultius utilitzats com a inòculs. Les soques o espècies preadaptades a condicions de baixa intensitat de llum estarien més capacitades per incrementar el seu contingut específic de pigments que aquelles soques no preadaptades. Overmann i col.laboradors (1992) ja van observar diferències destacables en el contingut específic de BCl *e* en diferents soques de *Chlorobium phaeobacteroides* incubades sota diferents intensitats de llum. Mentre que cultius de la soca MN1 – aïllada de 70 m de profunditat al Mar Negre– incubats a $0,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ van doblar el contingut específic de BCl *e* respecte d'altres crescuts a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la soca de col.lecció 2430 va disminuir-lo significativament sota les mateixes condicions de cultiu. El creixement de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides* a intensitats de llum sub-òptimes i crítiques en el primer bloc d'experiments descrits en el present capítol, només es pot explicar si aquestes espècies van poder desenvolupar un mecanisme alternatiu per contrarrestar la disminució del contingut de pigments antena. Aquest mecanisme es basaria en un canvi en la composició i organització pigmentària dels complexos antena i, més concretament, en un re-arranjament del contingut d'homòlegs de la BCl. Tot i que aquest canvi composicional de l'antena fotosintètica és més destacat en les espècies marrons, els resultats obtinguts amb *Chlorobium tepidum* indiquen que aquest procés també és present en les espècies verdes, malgrat que en proporcions més baixes. Sota condicions lumíniques apropiades, l'augment en el contingut de pigments antena no és incompatible amb la modificació qualitativa del contingut d'homòlegs i, per tant, ambdós processos es poden combinar, fet que resulta en una millora substancial en termes de rendiment (eficiència fotosintètica).

Atès que tant les bacterioclorofil·les (BCL *c*, *d* o *e*) com els carotenoides es troben gairebé de forma exclusiva en els clorosomes, un augment en el contingut d'aquests pigments ha de repercutir d'una manera o altra en el volum i/o nombre d'aquestes vesícules. En els bacteris fotosintètics verds, l'adaptació de l'antena a canvis en el règim lumínic es pot donar de diferents maneres. Una possibilitat és l'increment en el nombre d'unitats fotosintètiques (antena més centres de reacció) de composició

fixe. En aquest cas, s'hauria d'esperar una estequiometria constant entre la BCl *c*, *d* o *e* (antena) i la BCl *a* dels centres de reacció. Aquest tipus de resposta ha estat descrita per Pierson i Castenholz (1974b) i Feick *et al.*, (1982) en *Chloroflexus aurantiacus*. Una segona possibilitat seria la d'incrementar el contingut de pigments antena respecte els centres de reacció associats a la membrana, augmentant així la relació BCl antena/BCl *a*. Amb aquest segon tipus de resposta el volum dels clorosomes hauria d'augmentar ja que ja que s'haurien d'empaquetar més molècules de pigment (Sprague *et al.*, 1981; Betti *et al.*, 1982; Fuhrmann *et al.*, 1993). Finalment, la tercera possibilitat contemplaria una combinació d'ambdós processos, es a dir, un augment del nombre i del volum dels clorosomes sota intensitats de llum baixes (Holt *et al.*, 1966; Schmidt *et al.*, 1980; Golecki i Oelze, 1987; Foidl *et al.*, 1994). Les relacions entre la BCl antena i la BCl *a* calculades tant en *Chlorobium phaeobacteroides* (apartat 4.2.2) com en *Chlorobium tepidum* (apartat 4.2.3) permeten suggerir que l'adaptació a les baixes intensitats de llum es dona mitjançant un augment del volum dels clorosomes, i no per un increment en el seu nombre. Malgrat això, mancaria una confirmació visual al microscopi electrònic per constatar aquest extrem.

Durant el creixement de *Chlorobium phaeobacteroides* a diferents intensitats de llum, la relació entre el contingut específic de BCl *e* i la BCl *a* va mostrar un comportament singular (Figura 4.18.A). Els cultius incubats a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ van mantenir pràcticament constant el contingut específic de BCl *e* al voltant dels $150 \mu\text{g BCl } e \text{ mg prot}^{-1}$, mentre que la resta de cultius van augmentar-lo de manera inversament proporcional a la intensitat de llum, arribant a màxims de $700 \mu\text{g BCl } e \text{ mg prot}^{-1}$. El contingut específic de BCl *a*, en canvi, va manifestar un cert augment, passant de 5 a $35 \mu\text{g BCl } a \text{ mg prot}^{-1}$, tot i que en cap es va superar aquest darrer valor. L'augment i posterior saturació del contingut específic de BCl *a* suggereix que el nombre de molècules d'aquest pigment que formen part de la làmina basal del clorosoma és limitat, atès que la mida d'aquesta làmina sembla uniforme (Sprague *et al.*, 1981, 1986). Quan s'ha assolit aquest limit (que a *Chlorobium phaeobacteroides* correspondria a un contingut específic de $\approx 35 \mu\text{g BCl } a \text{ mg prot}^{-1}$), les restriccions físiques del clorosoma fan inviable un augment en el contingut de BCl *a*. Una segona conseqüència d'aquesta saturació és que descarta la possibilitat que la fotoadaptació es porti a terme mitjançant l'augment en el nombre de clorosomes per cèl.lula, ja que això resultaria en un increment del nombre de làmines basals, proteïnes FMO i centres de reacció associats i, per tant, de BCl *a*. D'acord amb això, i atès que en totes les espècies investigades es va registrar un increment en el contingut de pigments antena (BCl *c* o *e*) a intensitats baixes de llum, resulta evident que s'ha d'augmentar el volum dels clorosomes per permetre l'empaquetament de més molècules de pigment. *Chlorobium tepidum* també seguiria aquest comportament ja que el contingut específic de BCl *a* en els cultius incubats a diferents intensitats de llum es va mantenir força constant mentre que el de BCl *c* es va incrementar considerablement.

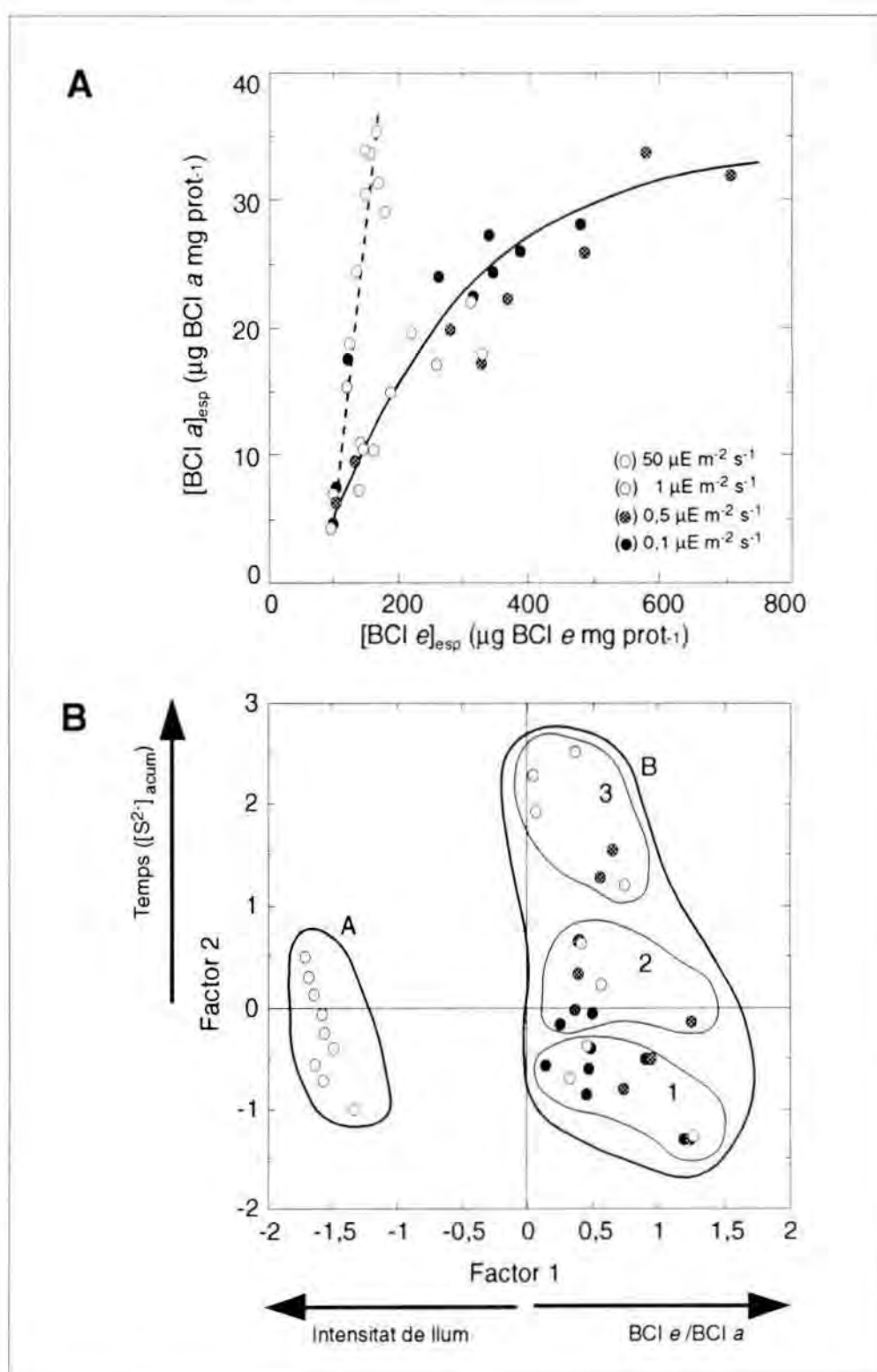


Figura 4.18. (A) Relació entre els continguts específics de BChl e i BChl a en cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a diferents intensitats de llum. (B) Distribució de les mostres anteriors en funció dels Factors 1 i 2 obtinguts en l'anàlisi de components principals (veure text).

Figure 4.18. (A) Relationship between the specific contents of BChl e and BChl a for *Chlorobium phaeobacteroides* cultures grown at the different light intensities. (B) Distribution of the same samples between Factor 1 and 2 obtained in the PCA (see text).

Si bé la figura 4.18.A dóna idea de la relació estequiomètrica entre la BCl *e* i la BCl *a* respecte la intensitat de llum, no ofereix una visió temporal de l'adaptació d'ambdós pigments durant el creixement de *Chlorobium phaeobacteroides*. Per tal de determinar com es veia afectada la composició pigmentària a mida que el cultiu anava creixent, es va recórrer a l'anàlisi de components principals (Figura 4.18.B). Aquest anàlisi es va realitzar sobre tres variables: intensitat de llum, concentració de S²⁻ consumit pel cultiu (com a estima del temps de creixement) i els valors corresponents de l'índex BCl *e*:BCl *a* mesurats durant el creixement. L'anàlisi va agrupar aquests valors en funció de dos factors: un Factor 1 (eix horitzontal) relacionat negativament amb la intensitat de llum i positiva amb l'índex BCl *e*:BCl *a*, i un Factor 2 (eix vertical) relacionat positivament amb l'edat del cultiu (S²⁻ consumit o temps de creixement). Les mostres es van agrupar en dos *clusters* clarament separats (A i B). El *cluster* A inclou les mostres corresponents als cultius incubats a 50 μE m⁻² s⁻¹, distribuïts clarament al llarg de l'eix temporal i caracteritzats per una intensitat de llum elevada i baixos valors del índex BCl *e*:BCl *a* que, a més, disminuirien lleugerament a mida que envellia el cultiu (component vertical, Factor 2). El *cluster* B agruparia la resta de mostres, caracteritzades per baixes intensitats de llum (0,1, 0,5 i 1 μE m⁻² s⁻¹) i continguts específics de BCl *e* alts (índex BCl *e*:BCl *a* elevats). Dins aquest *cluster* es poden diferenciar tres subgrups, distribuïts al llarg del component temporal, que correspondrien a les fases inicials de creixement (Subgrup B1), les fases intermitjies (Subgrup B2) i les fases més tardanes (Subgrup B3). La poca o nul·la representativitat dels valors corresponents als cultius incubats a 0,1 μE m⁻² s⁻¹ dins dels subgrups B2 i B3 és deguda a la dificultat d'aquests per créixer sota condicions crítiques de llum, i per tant, del baix consum de S²⁻.

Pel que fa els carotenoides, la majoria de cultius incubats a baixes intensitats de llum van mostrar un increment en el contingut específic d'aquests pigments, confirmant els resultats obtinguts per altres autors sota condicions experimentals similars (Schmidt *et al.*, 1980; Overmann *et al.*, 1992, Fuhrmann *et al.*, 1993). Malgrat això, cal destacar el diferent comportament de les espècies marrons respecte les verdes pel que fa l'augment en el contingut específic de pigments antena. A *Chlorobium phaeobacteroides*, l'increment en les concentracions específiques de BCl *e* i Isr va seguir una relació lineal (Figura 4.19), suggerint que la síntesi d'ambdós pigments es troba co-regulada, amb taxes pràcticament constants i independents de la intensitat de llum. A més, es pot arribar a observar una certa relació estequiomètrica entre aquests pigments dins el clorosoma que seria de 3 a 1 en favor de la BCl *e*. En canvi, les espècies verdes –*Chlorobium limicola*, *C. chlorovibrioides* i *C. tepidum*– es van caracteritzar per un contingut específic de carotenoides molt baix en comparació amb les espècies marrons. Sembla clar que aquest fet és una de les principals causes de l'escassa capacitat de les espècies verdes a créixer sota climes lumínics baixos.

Un cas a destacar és *Chlorobium tepidum*, ja que els cultius d'aquest bacteri incubats a intensitats baixes de llum (1 μE m⁻² s⁻¹) van mostrar un comportament interessant pel que fa els carotenoides. Per una banda, el contingut específic de Cbt no segueix la relació lineal mostrada per les espècies marrons, sinó que va presentar una saturació a partir d'un valor màxim de 20 μg Car μg prot⁻¹ (Figura 4.20). Un altre

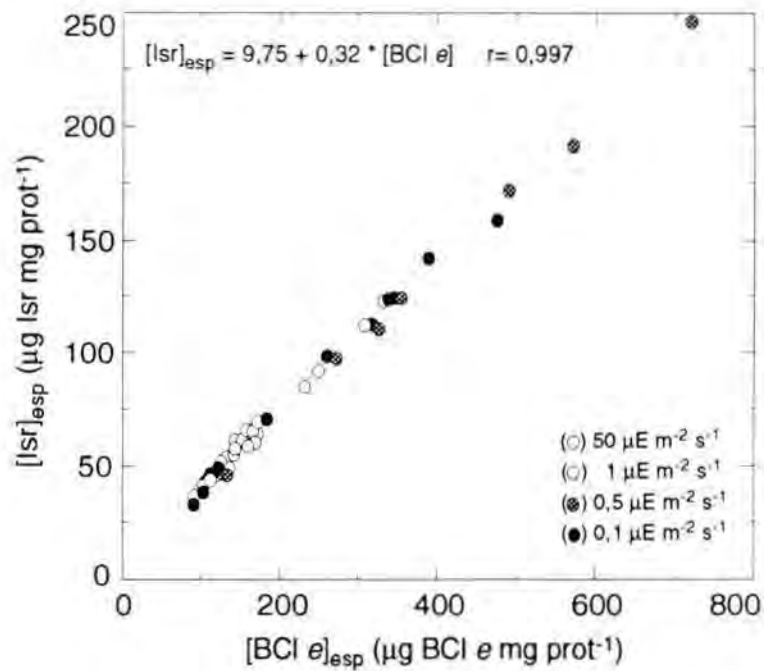


Figura 4.19. Relació entre els continguts específics de BChl e i Isp en cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a diferents intensitats de llum.

Figure 4.19. Linear relationship between the specific contents of BChl e and Isp for *Chlorobium phaeobacteroides* cultures grown at the different light intensities.

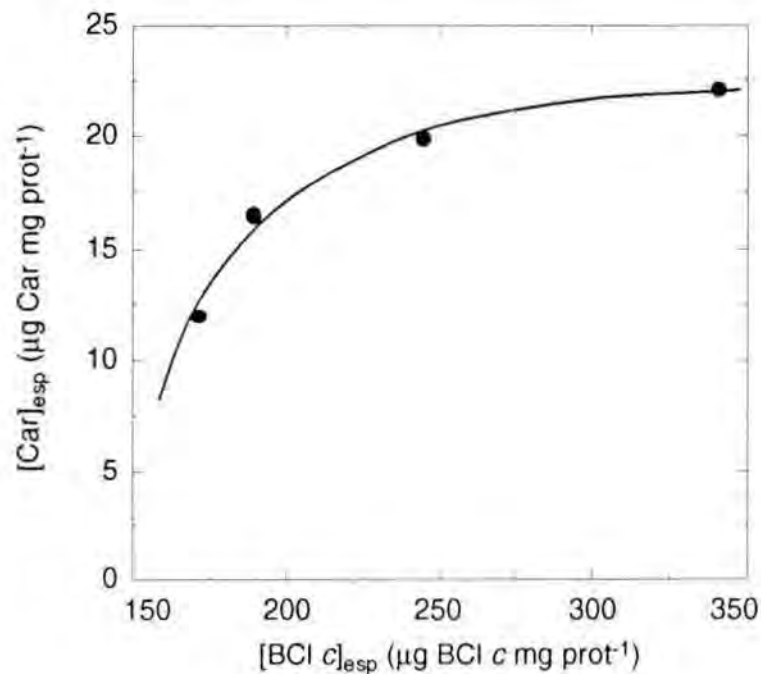


Figura 4.20. Relació entre els continguts específics de BChl c i carotenoides en els cultius de *Chlorobium tepidum* incubats a diferents intensitats de llum.

Figure 4.20. Relationship between the specific contents of BChl c and carotenoids for *Chlorobium tepidum* cultures grown at the different light intensities.

fet destacable fou la variació de la proporció entre les diferents formes de carotenoides. La manca d'informació referent a la localització dels carotenoides dins els clorosomes i el seu paper específic com a pigments antena fa difícil proposar una explicació adequada a aquestes observacions. La limitació espacial dins del clorosoma i una probable millora en l'absorció de la llum per part de les formes de Cbt enriquides, podrien ser les causes d'ambdós fenòmens.

4.3.2. Fotoadaptació qualitativa: canvis en la composició pigmentària i organització dels complexos antena

El procés fotoadaptatiu en els bacteris verds del sofre inclou un segon mecanisme que implica canvis en la composició pigmentària i organització dels clorosomes. Aquest mecanisme, que pot ser complementari o alternatiu a l'increment en el contingut específic de pigments antena, és el re-arranjament del contingut dels homòlegs principals de BCl. Malgrat que aquesta re-distribució selectiva dels diferents homòlegs és més aparent en les espècies marrons, també es present en les espècies verdes com és el cas de *Chlorobium tepidum*. L'absència de canvis en el CRH en els cultius control evidencia que el creixement i la síntesi de nou material cel·lular és indispensable per que es doni aquest re-arranjament. D'acord amb això, la menor capacitat de les espècies verdes en adaptar el seu CRH es correspondria amb les dificultats que presenten per créixer a intensitats de llum sub-òptimes i crítiques ($\leq 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

El creixement dels bacteris verds del sofre a intensitats baixes de llum dona lloc a canvis en la distribució dels homòlegs de la BCl *c* i *e*, que resulten sempre en un increment en el contingut dels homòlegs més alquilats. La biosíntesi d'homòlegs amb diferents graus d'alquilació a C-8 es dona per successives metilacions i reduccions gràcies a l'acció de l'enzim S-adenosil metionina (SAM) (Kenner *et al.*, 1978; Senge i Smith, 1995). Metilacions similars han estat proposades com les responsables dels canvis observats en el contingut i distribució d'homòlegs de *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum* sota NCIB 8327 i *C. vibrioforme* sota B1-20 incubats a baixes intensitats de llum (Huster i Smith, 1990; Bobe *et al.*, 1990). Malgrat que el procés de metilació és senzill, la manca de sistemes enzimàtics en la matriu clorosòmica (Blankenship *et al.*, 1995) fa que una vegada empaquetades les molècules de BCl dins els clorosomes ja no puguin ser modificades. L'enriquiment en homòlegs més alquilats sembla degut, doncs, a una síntesi selectiva de nou pigment seguida per un transport a l'interior del clorosoma més que no pas a metilacions de les molècules pre-existents. Atès que la intensitat de llum és la principal responsable de les variacions detectades en el contingut d'homòlegs, és probable que aquesta metilasa, o un enzim afí, depengui d'un gen o grups de gens l'expressió dels quals estigui regulada per la llum. Aquest tipus de regulació ha estat proposat també per Senge i Smith (1995).

Una explicació alternativa per explicar les variacions en la composició d'homòlegs seria la d'assumir que la taxa de metilació de les molècules de BCl depèn de la taxa de creixement del cultiu. Això influenciaria el temps en què les molècules de BCl

són susceptibles de ser metilades abans no siguin incorporades a la matriu clorosòmica on, com s'ha vist, no podrien ser modificades. Malgrat que descobriments recents amb *Chlorobium limicola* UdG6040 creixent en cultiu continu, semblen indicar que els canvis en la taxa de creixement alteren la taxa de metilació dels precursors de la BCl_c (Bañeras, comunicació personal), no sembla que sota condicions de limitació lumínica els canvis en el CRH tinguin aquest origen. De fet, els cultius de *Chlorobium limicola* i *C. chlorovibrioides* incubats a $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no van mostrar en cap cas variacions destacables en el contingut d'homòlegs, tot i que el temps disponible per la modificació de les molècules abans de ser incorporades als clorosomes fou suposadament superior atès que els cultius creixien a taxes deu vegades inferiors a les calculades per *Chlorobium tepidum* (Apartat 4.2.1).

Pel que fa als homòlegs secundaris, el seu paper en la fotoadaptació dels bacteris verds del sofre sembla poc o gens significatiu, ja que no es van detectar variacions en les seves proporcions relatives que poguessin indicar algun tipus de re-arranjament. A més, l'increment del contingut relatiu d'aquests pigments a mida que el cultiu envelleix sembla confirmar hipòtesis anteriors sobre l'origen d'aquests pigments, considerats productes finals de vies aberrants de síntesi degut a un estat fisiològic cel·lular deficient (Caple *et al.*, 1978). D'altra banda, no es pot assegurar que aquests pigments minoritaris mantinguin la seva capacitat com a antena, però això és probable atès que el seu espectre d'absorció és idèntic als dels homòlegs principals.

4.3.3. Interpretació fisiològica de les variacions en el contingut d'homòlegs

La significació funcional del re-arranjament d'homòlegs dins el procés global d'adaptació lumínica s'ha de considerar en base a dos punts de vista: i) que millori l'absorció selectiva de la llum degut al desplaçament del màxim d'absorció de l'antena fotosintètica (Q_y) i, ii) que, derivat de l'enriquiment de l'antena en homòlegs més alquilats, s'optimitzi la transferència d'energia des de les molècules antena als centres de reacció presents a la membrana.

En totes les espècies investigades es va produir un increment en el contingut d'homòlegs més alquilats (BChl_Fc_{3-e3} i BChl_Fc_{4-e4}, identificats com [Pr, E] i [iB, E] BChl_Fc-e, respectivament). L'enriquiment de l'antena en [Pr, E] BChl_Fc-e i [iB, E] BChl_Fc-e té conseqüències directes en la naturalesa dels agregats formats a expenses d'aquests homòlegs (Huster i Smith, 1990), ja que la mida de l'agregat està controlada indirectament pel grau d'alquilació de C-8 i per la estereoisomeria del centre quiral en C-3' (Nozawa *et al.*, 1992; Holzwarth i Schaffner, 1994; Senge i Smith, 1995). A més, existeix una forta dependència de l'espectre d'absorció en solvents no polars del tamany dels substituents a C-8, ja que el màxim d'absorció es troba més desplaçat cap al vermell en aquells agregats formats per homòlegs més alquilats (Smith *et al.*, 1983). La presència majoritària a *Chlorobium vibrioforme* de l'homòleg [E, E] BChl_Fc provoca un desplaçament del màxim d'absorció de llum cap a longituds d'ona més curtes respecte aquelles soques que disposen de tota la varietat d'homòlegs (Huster i Smith, 1990). D'altra banda, modificacions i desplaçaments del màxim

d'absorció similars a aquests últims s'han observat en agregats formats espontàniament tant en solvents no polars (Brune *et al.*, 1987a; 1988; Olson i Pedersen 1988; 1990; Olson *et al.*, 1990; Uehara i Olson 1992) com en tampons aquosos (Hirota *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1993a, b; Uehara *et al.*, 1994).

Els resultats presentats estan d'acord amb aquestes observacions, ja que l'enriquiment en derivats més alquilats resulta en un desplaçament dels màxims d'absorció i, com s'ha comprovat per *Chlorobium tepidum*, també del de fluorescència. Desplaçaments semblants del màxim d'absorció han estat observats per Broch-Due *et al.* (1978) i Bobe *et al.* (1990) sota condicions experimentals similars. A més, s'ha vist que tant en les espècies verdes com en les marrons, la localització del màxim Q_y de la BCl *in vivo* està clarament correlacionada amb el contingut relatiu dels homòlegs més alquilats (Figura 4.21). Malgrat això, el benefici que pot obtenir la cèl.lula en termes d'absorció directa de la llum no és evident, ja que en el millor dels casos el desplaçament del màxim Q_y és de 10-15 nm. El desplaçament del màxim d'absorció de l'antena només resultaria útil doncs, en aquells casos en què es donés una alteració qualitativa de la llum. Un exemple concret serien les poblacions naturals de bacteris verds del sofre en llacs estratificats, on la llum disponible és filtrada selectivament per les poblacions de microorganismes fotosintètics que es troben en zones superiors (Vila i Abella, 1994; Vila, 1996). Tot i així, aquest guany de l'antena en termes d'absorció lumínica és improbable (veure Capítol 5).

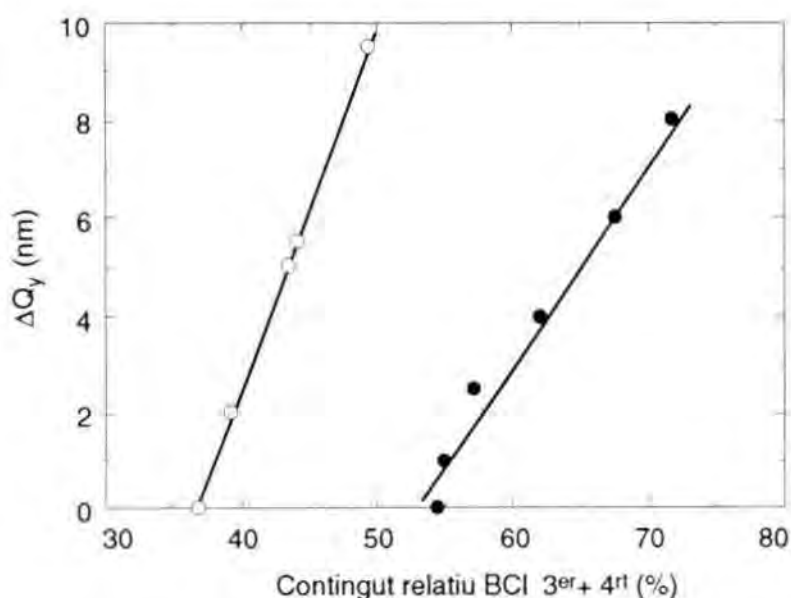


Figura 4.21. Relació entre el contingut relatiu (en %) del tercer i quart homòlegs de la BCl *c-e* i l'increment en el màxim Q_y en cultius de *Chlorobium tepidum* (○) i *C. phaeobacteroides* (●) incubats a diferents intensitats de llum. Els valors inicials dels màxims eren 750 i 721 nm per la BCl *c* i la BCl *e*, respectivament.

Figure 4.21. Relationship between the relative content (in %) of the third and the fourth BChl *c* and *e* homologs and the increment in the absorption wavelength of the Q_y maximum (in nm) for *Chlorobium tepidum* (○) and *C. phaeobacteroides* (●) cultures grown at different light intensities. The initial Q_y values were 750 and 721 nm for the BChl *c* and BChl *e*, respectively.

D'altra banda, la variació en la distribució dels homòlegs podria ser un reflex de canvis en l'organització de les molècules de BCl en els clorosomes que milloressin la transferència de l'energia entre les diferents molècules antena i des d'aquestes fins els centres de reacció en la membrana. És conegut que l'enriquiment de l'aparell fotosintètic en pigments antena d'absorció a longituds d'ona elevades contribueix a la concentració d'excitons al voltant del CR (Fetisova *et al.*, 1988; Fisher i Hoff, 1992; Trissl, 1993; van Grondelle *et al.*, 1994). De fet, s'ha demostrat que en els clorosomes d'algunes espècies dels bacteris verds del sofre coexisteixen molècules antena de BCl estàndard amb d'altres amb absorció a longituds d'ona més llarga (Otte *et al.*, 1991; Mimuro *et al.*, 1994), les quals formen un gradient d'alquilació creixent des de la part superior del clorosoma fins a la làmina basal, propera a la membrana. Aquesta distribució heterogènia s'ha interpretat com un mecanisme per canalitzar l'excitació cap el centre de reacció, minimitzant la dispersió a l'atzar de l'energia (Otte *et al.*, 1993; van Noort *et al.*, 1994).

Una hipòtesi plausible observaria l'existència d'un mecanisme mitjançant el qual els bacteris verds del sofre –especialment les espècies marrons–, sota condicions de limitació lumínica, podrien redirigir selectivament la síntesi de pigment cap a la formació d'homòlegs més alquilats. Utilitzant aquesta estratègia, l'energia d'excitació es canalitzaria vers els centres de reacció mitjançant un gradient de molècules i agregats amb absorció a longituds d'ona consecutivament més desplaçades cap el vermell (Figura 4.22). Això minimitzaria la dispersió a l'atzar de l'excitació entre les molècules antena i s'optimitzaria, per tant, el rendiment. Malgrat que en cap dels casos estudiats s'han pogut calcular les taxes de transferència d'energia entre les molècules antena i els centres de reacció, cal considerar tres punts que fan factible aquesta hipòtesi. En primer lloc, l'increment en l'amplada de la banda Qy, tot i que lleuger, indica un augment en el nombre de components minoritaris que componen l'antena. En *Chloroflexus*, aquests components minoritaris semblen jugar un paper destacat en la transferència seqüencial de l'energia cap els CR (Mimuro *et al.*, 1994). En segon lloc, s'ha de considerar la importància del desplaçament cap el vermell del màxim de fluorescència de la BCl c observat en els clorosomes aïllats de les cèl·lules de *Chlorobium tepidum* incubades a intensitats baixes de llum. Un desplaçament d'aquest tipus podria tenir un paper destacat en l'optimització de la transferència d'energia atès que aquesta és més ràpida com més gran és el solapament entre l'espectre de fluorescència de la molècula donadora i l'espectre d'absorció de l'acceptora (Förster, 1965; Blankenship *et al.*, 1990; Causgrove *et al.*, 1992). Finalment, i malgrat que els processos de rearranjament d'homòlegs observats en *Chloroflexus* i els descrits aquí en bacteris verds del sofre s'han de comparar amb una certa reserva, s'ha observat que l'energia d'excitació es transfereix més ràpid en clorosomes de *Chloroflexus aurantiacus* aïllats de cèl·lules incubades a baixes intensitats de llum, que en aquells aïllats a partir de cèl·lules crescudes a intensitats de llum deu vegades superiors (Ma *et al.*, 1996).

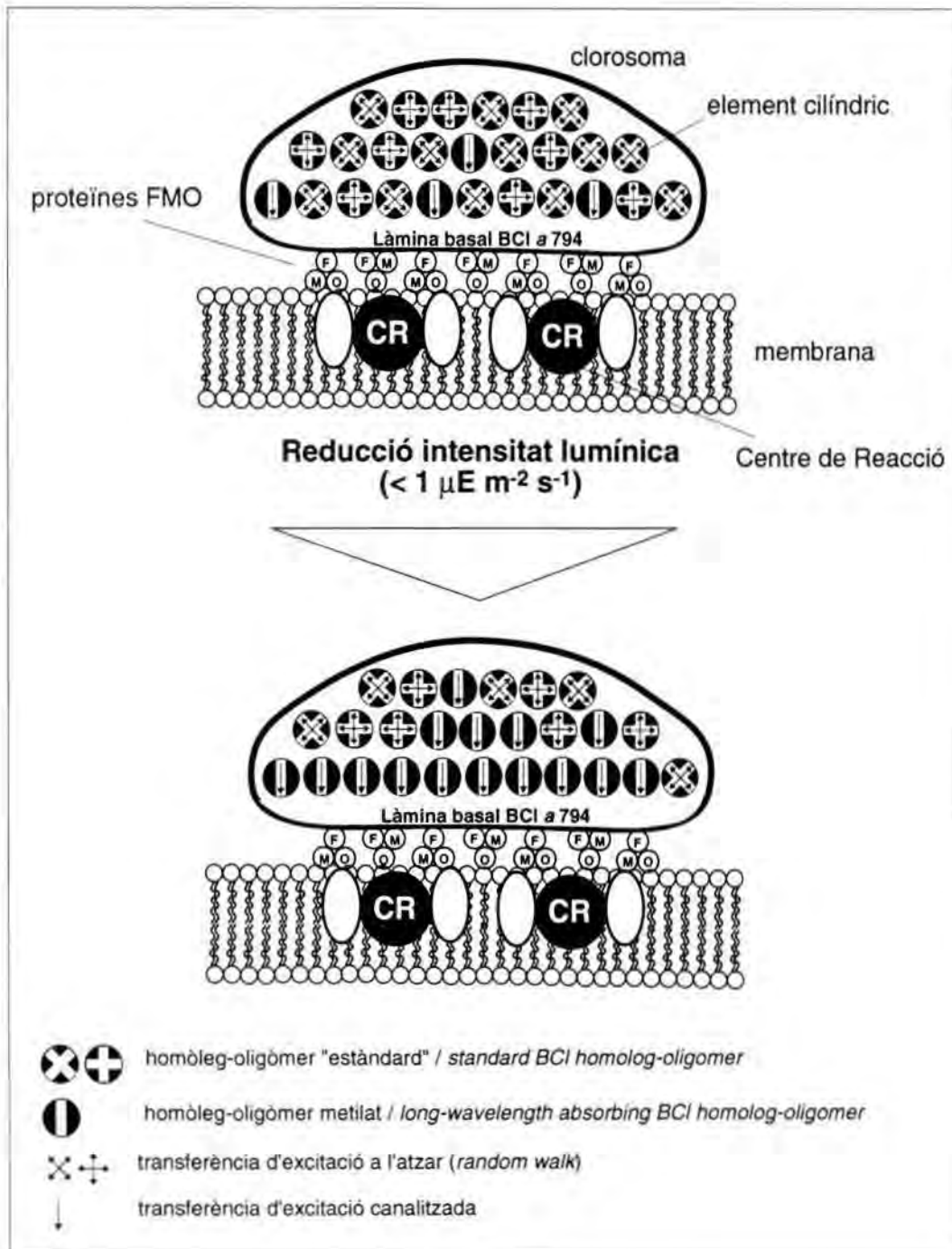


Figura 4.22. Representació esquemàtica de l'enriquiment del clorosoma en homòlegs més alquilats sota condicions de baixa intensitat lumínica. Aquests homòlegs, i els agregats que formen, es localitzarien més propers a la làmina basal i canalitzarien el fluxe d'excitació cap el centre de reacció, minimitzant la dispersió a l'atzar de l'energia.

Figure 4.22. Schematic view of the enrichment of chlorosome in highly alkylated homologs under low light intensities. These homologs, and the aggregates that they can form, would be arranged near the baseplate, allowing the funnel of excitation towards the reaction center. Under these conditions, random walk of excitation is minimized.

En resum, l'enriquiment de l'antena en homòlegs més alquilats té dues conseqüències. En primer lloc, facilita l'empaquetament de més molècules antena dins la matriu clorosòmica gràcies a l'augment de la capacitat d'agregació i compactació dels agregats formats a partir d'aquests homòlegs. La utilitat d'un major empaquetament de molècules antena dins el clorosoma resulta òbvia davant episodis de limitació lumínica. Una segona conseqüència, seria la de facilitar la canalització de l'excitació vers els centres de reacció, optimitzant així el rendiment del complex antena. L'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum s'ha d'entendre, doncs, com una combinació d'ambdós processos.

**5. HETEROGENEÏTAT DELS
PIGMENTS ANTENA EN
POBLACIONS NATURALS
DE BACTERIS VERDS**



5.1. INTRODUCCIÓ

La distribució dels bacteris fotosintètics del sofre en ambients naturals està lligada a la presència simultània de llum i sulfhídric (Pfennig, 1978). Allà on coincideixen ambdós elements es poden observar macroscòpicament acumulacions d'aquests bacteris de color vermell, verd o marró depenent de l'espècie enriquida. Els bacteris fotosintètics del sofre són presents en multitud d'ambients: hipolimnion de llacs estratificats, llacunes o basses estancades, estuaris, fiords, llacunes costaneres, tapissos microbians, sediments anaeròbics i en ambients extrems, com llacs hipersalins o fonts termals sulfuroses (Pfennig, 1989).

La presència en llacs estratificats de denses poblacions de bacteris verds del sofre ha estat descrita per diferents autors (van Gemerden, 1967; Cohen *et al.*, 1977; Trüper i Genovese, 1968; Takahashi i Ichimura, 1968; 1970; Steenbergen i Korthals, 1982; Guerrero *et al.*, 1985; 1987; Riera *et al.*, 1988). Les condicions fisico-químiques de l'ecosistema (intensitat i qualitat de la llum, pH, salinitat, concentració de sulfhídric, nutrients) són les que determinen la distribució, composició i densitat de la comunitat bacteriana fotosintètica (Matheron i Baulaigue, 1977; Parkin i Brock, 1980a, b; Pedrós-Alió *et al.*, 1983; Borrego *et al.*, 1993; Vila i Abella, 1994; van Gemerden i Mas, 1995). La pròpia comunitat bacteriana s'auto-distribueix en la columna d'aigua en funció dels seus requeriments fisiològics, trobant-se associada normalment a les zones de gradient fisico-químic i, més concretament, a la interfase oxigen-sulfhídric (Montesinos, 1981; Pfennig, 1989; Montesinos i van Gemerden, 1986). La comunitat bacteriana fotosintètica, constituïda generalment per Cromatiàcies i bacteris verds del sofre, és de gran importància dins l'ecosistema ja que és la responsable de la interconnexió dels cicles del C i el S (Parkin i Brock, 1981; Montesinos i van Gemerden, 1986; Steenbergen *et al.*, 1987).

Les particulars característiques tant de l'estany de Banyoles com de la resta d'estanyols de la seva conca lacustre els fan idonis per l'estudi dels bacteris fotosintètics del sofre. Això s'ha reflectit en un gran nombre de treballs d'investigació realitzats sobre la presència d'aquests bacteris en aquests ecosistemes (Guerrero i Abella, 1978; Abella, 1980; Guerrero *et al.*, 1980; 1985; 1987; Montesinos, 1982; Montesinos i Esteve, 1984; Pedrós-Alió *et al.*, 1983; 1984; van Gemerden *et al.*, 1985; Garcia-Gil *et al.*, 1987; Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992; Garcia-Gil i Abella, 1992; Garcia-Gil *et al.*, 1993; Borrego i Garcia-Gil, 1994). En aquests treballs es recullen diferents aspectes de l'ecologia i la fisiologia de les poblacions naturals de bacteris fotosintètics del sofre així com el seu paper en la dinàmica de l'ecosistema. Malgrat que la majoria d'aquests estudis destaquen les singulars característiques adaptatives dels bacteris verds del sofre al clima lumínic present en els seus hàbitats, són escassos els treballs que fan èmfasi en el mecanisme mitjançant el qual això es porta a terme (Abella *et al.*, 1980; Montesinos *et al.*, 1983; Overmann *et al.*, 1992). Una possible raó a la manca d'estudis d'aquests tipus ha estat la dificultat en la determinació acurada dels diferents tipus de pigments, incrementada recentment pel descobriment de tota la sèrie d'homòlegs estructurals de les diferents bacterioclorofil·les.

L'espectrofotometria ha estat tradicionalment l'eina utilitzada per l'anàlisi dels pigments fotosintètics dels diferents organismes fotosintètics eucariotes i procariotes (Richards i Thompson, 1952; Parsons i Strickland, 1963; Lorenzen, 1967; Rai, 1973; Jeffrey i Humphrey, 1975). Tot i la senzillesa i rapidesa en el seu ús, l'espectrofotòmetre pot portar a errors d'identificació i quantificació dels diferents pigments, especialment evidents en el cas de poblacions fotosintètiques codistribuides en la columna d'aigua. Els resultats que es deriven d'aquestes anàlisis poden portar a interpretacions errònies sobre la distribució i abundància de les poblacions estudiades (Talling i Driver, 1961; Parsons i Strickland, 1963; Hallegraeff, 1976; Otsuki i Takamura, 1988; Jacobsen i Rai, 1990). Per solventar aquests problemes es van posar a punt altres tècniques analítiques com ara la fluorimetria (Holm-Hansen *et al.*, 1965; Coveney, 1982; Trees *et al.*, 1985; Neveaux i de Billy, 1986) i la cromatografia en capa fina (Jeffrey, 1961; 1968; 1974; 1981; Bunt, 1964). Tot i això, els desavantatges que presenten aquests mètodes –complexitat, necessitat d'elevades concentracions de pigment, llargs temps d'anàlisi i aparició d'artefactes– han contribuït a que la seva utilització rutinària hagi caigut en desús. D'altra banda, els mètodes proposats per corregir les interferències entre pigments algals i bacterians (Tolstoy i Tóth, 1980; Caraco i Pucoon, 1986) no han ofert una solució prou satisfactòria i, en alguns casos, han estat matèria de controvèrsia doncs no solen tenir en compte les similituds espectrals entre la clorofil·la *a* i les diferents bacterioclorigil·les (Knowlton *et al.*, 1989; Caraco, 1989).

L'aplicació en els darrers anys de la cromatografia líquida d'alta resolució (o HPLC, acrònim de l'anglès *High Performance Liquid Chromatography*) a l'estudi dels pigments fotosintètics, ha solucionat alguns dels problemes esmentats. L'anàlisi i identificació dels pigments algals, tant clorigil·les com carotenoides, mitjançant aquesta tècnica es va començar a finals de la dècada dels 70 (Eskins *et al.*, 1977; Jacobsen, 1978; Fiksdahl *et al.*, 1978; Abaychi i Riley, 1979), i s'ha anat incorporant progressivament en les anàlisis rutinàries degut a la seva precisió i sensibilitat (Falkowski i Sucher, 1981; Schwartz i Von Elbe, 1982; Gieskes i Kraay, 1983; 1986; Mantoura i Lewellyn, 1983; Wright i Shearer, 1984; Bidigare *et al.*, 1985; Zapata *et al.*, 1987; Neelis i De Leenher, 1989; Vedhuis i Kraay 1990; Sholz i Ballsmier, 1981; Fernandez-Lopez *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1991; Kraay *et al.*, 1992). La HPLC resulta també extremadament útil en l'estudi de pigments bacterians ja que resol les principals limitacions del mètode espectrofotomètric: i) discrimina cadascun dels pigments d'entre l'elevada diversitat existent i, ii) evita les interferències provocades per d'altres pigments (Cl *a*, carotenoides algals, etc).

Atès que en capítols anteriors s'ha demostrat el paper crític de la intensitat de llum en la composició d'homòlegs de les BCl, el principal objectiu dels treballs recollits en aquest capítol fou el de constatar aquestes hipòtesis en poblacions naturals de bacteris verds del sofre. Amb aquest objectiu es va realitzar el seguiment des del punt de vista pigmentari de dues poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* a les cubetes III i IV de l'estany de Banyoles i el d'una comunitat fotosintètica constituïda per *Pelodictyon clathratiforme* i "Chlorochromatium aggregatum" a l'estanyol

Coromina. D'altra banda, es va estudiar també la diversitat en quant els patrons pigmentaris d'homòlegs de diferents poblacions de bacteris fotosintètics verds desenvolupades en llacs tant d'Europa com d'Estats Units sota condicions de creixement diverses.

5.2. RESULTATS

La presentació dels resultats s'ha dividit en cinc subapartats. En el primer es presenta l'entorn físico-químic dels ecosistemes estudiats, en especial l'evolució dels principals paràmetres que influeixen en el creixement i la distribució dels bacteris fotosintètics del sofre –temperatura, conductivitat, penetració de la llum, oxigen dissolt i concentració de sulfhídric. Malgrat pertànyer a un entorn biòtic, també s'ha inclòs aquí el seguiment de les poblacions algals –concentració de Cl α – ja que afecten notablement el desenvolupament de les poblacions bacterianes fotosintètiques (Montesinos i Esteve, 1984). Les comunitats fitoplànctòniques però, no han estat objecte d'estudi exhaustiu ja que queden fora de l'àmbit central de la investigació.

En la resta de subapartats s'exposen els resultats sobre el seguiment dels pigments de les poblacions bacterianes fotosintètiques, tant dels bacteris vermells (Cromatiàcies) com verds del sofre durant els períodes de creixement (C-III, C-IV i estanyol Coromina) o en moments concrets del seu desenvolupament (llacunes costeneres de Mallorca, llacs Centreuropa i EEUU). L'estudi dels pigments fotosintètics d'aquestes poblacions s'ha realitzat mitjançant espectrofotometria i HPLC. Això ha permès per una banda la quantificació individualitzada de cadascun dels diferents homòlegs de les bacterioclorofil·les i per l'altra, la comparació dels resultats obtinguts i l'avaluació dels errors derivats de l'aplicació de la tècnica espectrofotomètrica tradicional.

5.2.1. Entorn físico-químic

5.2.1.1. *Cubeta III*

- Temperatura

En els dos períodes estudiats, la termoclina de C-III localitzada inicialment entre els 5 i 12 metres, es va desplaçar progressivament en profunditat fins a 9-15 metres l'any 1994 i fins a 12-16 metres l'any 1995 (Figura 5.1.A). El desplaçament vertical del gradient tèrmic, comú dels llacs monomíctics de regions temperades, fou conseqüència del progressiu escalfament de l'epilimnion (Margalef, 1983). Durant aquesta fase les temperatures de l'epilimnion van oscil·lar entre 16 i 27°C. A l'hipolimnion la temperatura es mantingué a 13° C durant tot l'estudi.

Malgrat no disposar de les dades de temperatura durant l'època invernal, hom pot considerar que la mescla vertical es va produir al mes de novembre, d'acord amb la incipient erosió de la termoclina observada durant la tardor (Figura 5.1.A), i amb resultats obtinguts en cicles anteriors (Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992).

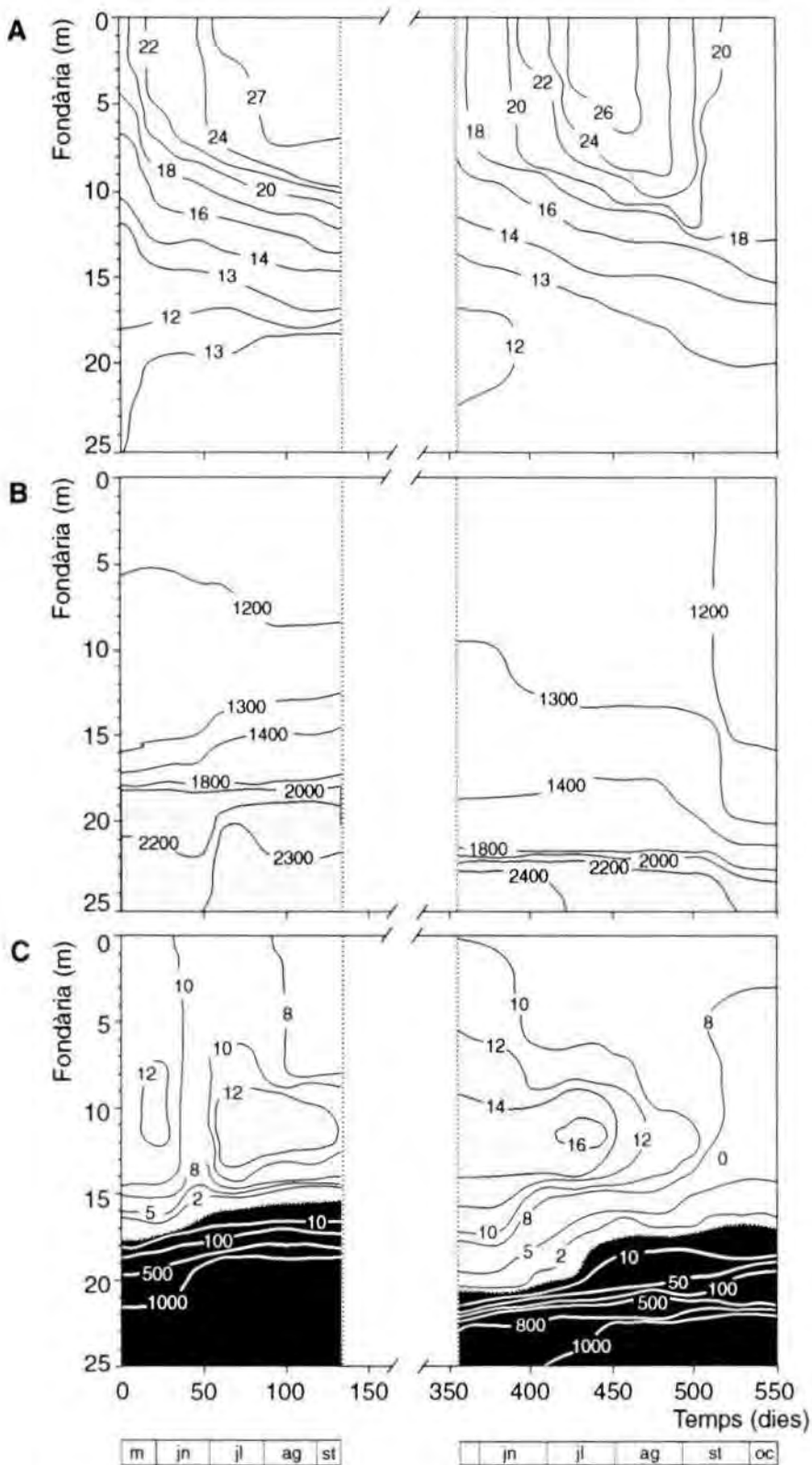


Figura 5.1. Distribució espàcio-temporal de (A) la temperatura (en $^{\circ}\text{C}$), (B) la conductivitat (en $\mu\text{S cm}^{-1}$) i (C) la concentració d'oxigen dissolt (en mg l^{-1}) (C) i la concentració de sulfhídric (línia blanca, en $\mu\text{mol l}^{-1}$) a C-III durant els dos períodes d'estratificació estudiats. Els cercles grisos representen els punts de mostratge.

Figure 5.1. Time-depth distribution of (A) temperature (in $^{\circ}\text{C}$), (B) conductivity (in $\mu\text{S cm}^{-1}$) and (C) dissolved oxygen (in mg l^{-1}) and sulfide concentrations (white line, in $\mu\text{mol l}^{-1}$) in C-III during the study period. Gray dots indicate sampling points.

- Conductivitat

L'estratificació química característica d'algunes cubetes de l'Estany és conseqüència de l'entrada d'aigua subterrànea altament sulfatada ($\approx 0,8 \text{ g l}^{-1}$) per les surgències del fons. Aquesta estratificació es pot considerar estable durant tot l'any (*meromixi crenogènica*). A C-III, el gradient químic registrat passava de $1300 \mu\text{S cm}^{-1}$ a $2300 \mu\text{S cm}^{-1}$ en una franja d'aigua molt estreta (de 0,5 a 1,5 m) (Figura 5.1.B). En ambdós cicles estudiats els valors de conductivitat del mixolimnion foren similars ($1300 \mu\text{S cm}^{-1}$). Per sota de la quimioclina, el monimolimnion presentava valors de conductivitat al voltant de $2300\text{-}2400 \mu\text{S cm}^{-1}$.

El gradient químic va variar la seva posició d'un any a l'altre. L'any 1994 es va localitzar entre 17,5 i 18 m mentre que l'any 1995 es trobava entre 21,5 i 22 m. Aquesta variació en la localització de la quimioclina pot ser atribuïble tant a fenòmens puntuals i violents de mescla com a oscil·lacions del flux d'entrada d'aigua subterrànea (Roget i Casamitjana, 1987). La localització menys profunda de la quimioclina durant 1994 es pot considerar excepcional atès la seva habitual localització (19-21 m) (Abella, 1980; Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992). Assumint que el volum del monimolimnion sembla estar relacionat amb el flux d'aigua surgent, la localització més amunt de la quimioclina es pot atribuir a un increment del flux de la surgència subterrànea durant l'hivern de 1993. Durant 1995, la quimioclina de C-III es va localitzar entre 20 i 21 m.

- Oxigen dissolt

La distribució espàcio-temporal de la concentració d'oxigen dissolt a la cubeta III fou similar en ambdós períodes estudiats (Figura 5.1.C). A l'epilimnion els valors van oscil·lar entre 8 i 12 mg l^{-1} . En aquesta zona de la columna d'aigua van destacar només alguns màxims estivals al voltant dels $15\text{-}16 \text{ mg l}^{-1}$.

La producció i difusió de sulfhídric (H_2S) al sediment com a conseqüència de les condicions reductores i l'activitat sulfat-reductora va provocar l'esgotament de l'oxigen monimolimnètic i la generació d'un gradient enfrontat a nivell de la quimioclina. Aquesta interfase $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$ es va desplaçar cap amunt a mida que avançava el període d'estratificació (Figura 5.2.A).

- Concentració de sulfhídric

L'elevada concentració de sulfats de l'aigua que alimenta l'estany de Banyoles fa que el cicle del sofre sigui especialment actiu. Els sulfats, sota condicions d'anaerobiosi, poden ser utilitzats pels bacteris sulfat reductors com acceptors d'electrons, produint sulfhídric. La producció, acumulació i difusió d'aquest compost depèn de diversos factors, com ara la fondària i morfologia de la cubeta, l'estabilitat de la massa d'aigua i la càrrega orgànica del sediment.

A C-III, la presència de sulfhídric es va restringir al monimolimnion anòxic (Figura 5.1.C). Les concentracions de H_2S mesurades foren similars en ambdós períodes d'estudi assolint màxims de $1000 \mu\text{mol l}^{-1}$. La distribució temporal d'aquest compost ve determinada per la seva producció al sediment i la posterior difusió cap a les zones superiors. L'increment de la producció i difusió a mida que avançava

l'estratificació va derivar en un increment del gruix del monimolimnion anaerobic, especialment important l'any 1995 (de 4 m durant el mes de maig a 8 m registrats a l'octubre), que va causar el desplaçament ascendent de la interfase O_2/H_2S .

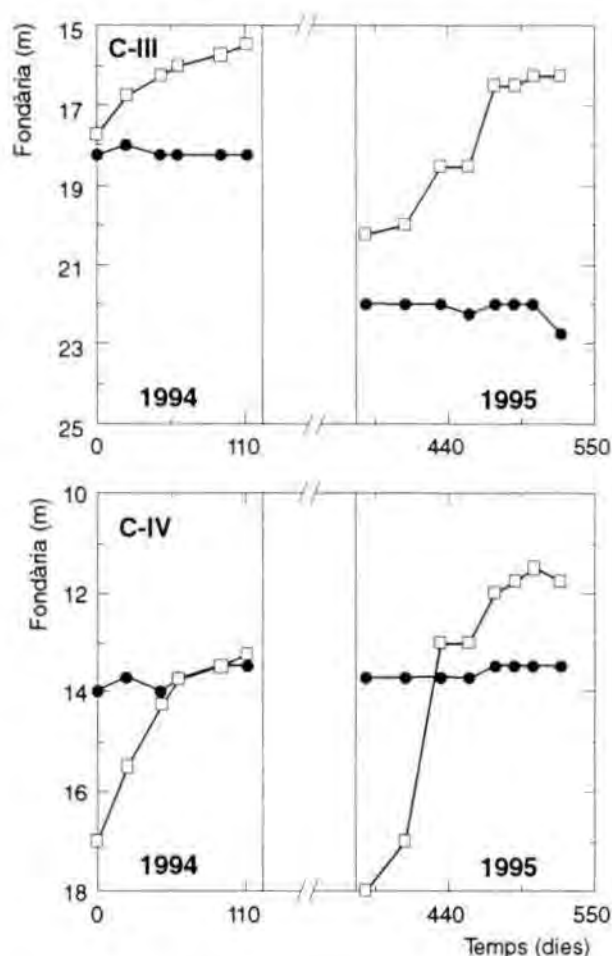


Figura 5.2. Localització i evolució temporal de la quimioclina (●) i la interfase O_2/H_2S (○) a C-III i C-IV durant els dos períodes estudiats.

Figure 5.2. Location and temporal evolution of the chemocline (●) and the oxic-anoxic boundary layer (○) in C-III and C-IV during the study period.

- Penetració de la llum

La figura 5.3.A recull perfils d'extinció vertical de la llum representatius de cadascun dels períodes estudiats. Els valors dels coeficients d'extinció calculats a l'epi- (η_{epi}), meta- (η_{met}) i monimolimnion (η_{mon}) es recullen a la taula 5.1. La comparació entre els valors de h calculats a C-III i a C-IV resulta interessant. El mixolimnion (epi- i metalimnion) d'ambdues cubetes és homogeni i pràcticament idèntic des del punt de vista lumínic. Això estaria d'acord amb la hipòtesi que les cubetes de l'estany comparteixen un mateix mixolimnion, diferint en les característiques físico-químiques i biològiques dels respectius monimolimnia (Garcia-Gil i Abella, 1992). L'extinció més intensa de la llum va donar-se per sota la quimioclina ($\eta_{mon} = 4$ i 2 als cicles de 1994 i 1995, respectivament) degut a la presència en aquesta zona d'una densa població de *Chlorobium phaeobacteroides* (veure apartat 5.2.3).

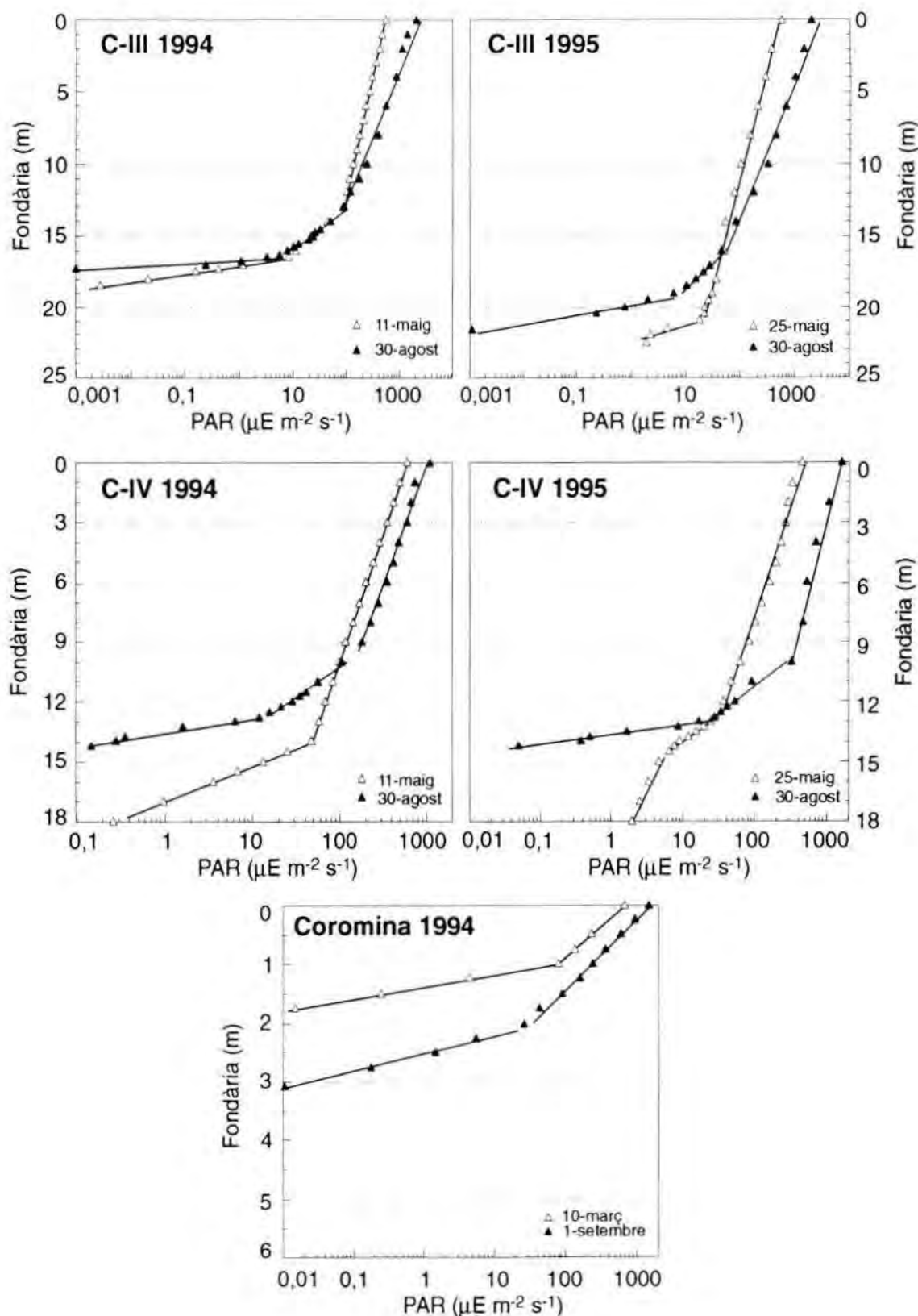


Figura 5.3. Perfils d'extinció vertical de la llum a C-III, C-IV i l'estanyol Coromina en diferents moments dels períodes d'estratificació estudiats.

Figure 5.3. Vertical light extinction profiles in C-III, C-IV, and Coromina lagoon in different moments of the study period.

Taula 5.1. Coeficients d'extinció calculats a C-III, C-IV i a l'estanyol Coromina en dos moments diferents dels cicles estudiats. η_{epi} , η_{met} i η_{mon} : Coef. d'extinció al epilimnion, metalimnion i monimolimnion, respectivament.

Taula 5.1. Extinction coefficients calculated in C-III, C-IV, and Coromina lagoon in two different moments of the studied periods. η_{epi} , η_{met} i η_{mon} : Extinction coefficients at the epilimnion, metalimnion, and monimolimnion, respectively.

Lloc	Data	η_{epi}	η_{met}	η_{mon}
C-III	11-05-1994	0,14	0,67	4,00
	30-08-1994	0,24	0,81	4,20
	25-05-1995	0,16	–	2,10
	30-08-1995	0,24	0,58	2,20
C-IV	11-05-1994	0,18	–	1,30
	30-08-1994	0,25	1,11	5,70
	25-05-1995	0,15	–	2,10
	30-08-1995	0,16	0,99	3,40
Coromina	10-03-1994	2,14	11,67	–
	01-09-1994	2,03	6,64	–

- Clorofil.la *a*

La presència de comunitats algals en la zona de la interfase òxico-anòxica on es va realitzar el mostreig fou escassa degut a la seva profunda localització. Les màximes concentracions de Cl *a* mesurades durant els dos períodes estudiats foren sempre inferiors a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$. Aquestes concentracions minvaven fins a valors de 2 a 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ a mida que es penetrava en el monimolimnion anaeròbic. Aquí, la presència d'algues s'explica per la retenció que el canvi de densitat exerceix sobre les algues que es troben en trànsit de sedimentació.

5.2.1.2. Cubeta IV

- Temperatura

A C-IV, la zona ocupada pel gradient tèrmic fou més ampla (de 8 a 13 m) que la observada a C-III (Figura 5.4.A). Les temperatures de l'epilimnion van oscil·lar entre 19 i 27°C, disminuint en la zona de gradient fins a 17°C. Des del punt de vista tèrmic no es van registrar diferències significatives en la columna d'aigua entre ambdós períodes estudiats. Les diferències tèrmiques entre el monimolimnion de C-IV (17°C) i el de C-III (13°C) foren degudes a la diferent profunditat de les mateixes. De la mateixa manera que a C-III, la barreja tèrmica es va iniciar durant el mes d'octubre, completant-se durant el mes de novembre en ambdós cicles.

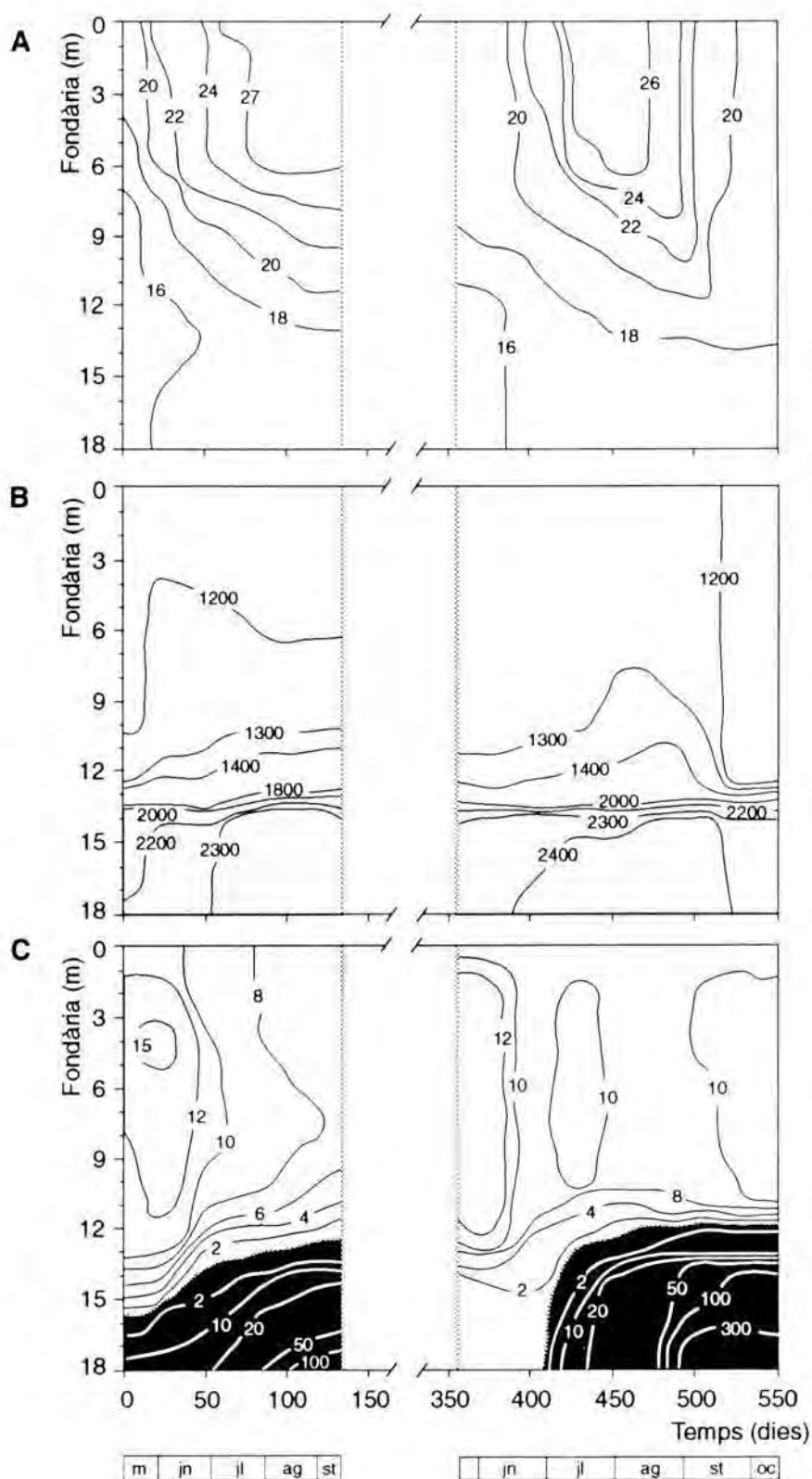


Figura 5.4. Distribució espàcio-temporal de (A) la temperatura (en °C), (B) la conductivitat (en $\mu\text{S cm}^{-1}$) i (C) la concentració d'oxigen dissolt (en mg l^{-1}) i la concentració de sulfhídric (línia blanca, en $\mu\text{mol l}^{-1}$) a C-IV durant els dos períodes d'estratificació estudiats.

Figure 5.4. Time-depth distribution of (A) temperature (in °C), (B) conductivity (in $\mu\text{S cm}^{-1}$) and (C) dissolved oxygen (in mg l^{-1}) and sulfide concentrations (white line, in $\mu\text{mol l}^{-1}$) in C-IV during the study period.

- Conductivitat

Igual que a C-III, l'estructura física de la columna d'aigua està condicionada per la presència d'una capa d'aigua més conductora al fons de la cubeta. En la cubeta IV es va establir un gradient suau de conductivitat al mixolimnion que va augmentar brúscament de 1800 a 2300 $\mu\text{S cm}^{-1}$ de 13,25 a 13,5 m (Figura 5.4.B). El monolimnion ocupava des de 13,5 a 18 m amb lleugeres variacions al llarg de l'estudi. Al mixolimnion es van assolir valors de 1200-1300 $\mu\text{S cm}^{-1}$ mentre que al monolimnion els valors mesurats foren de 2300 a 2400 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Aquests valors es van mantenir constants durant els dos cicles.

Entre C-III i C-IV les úniques diferències observades foren en la localització de la quimioclina. A diferència de C-III, la quimioclina de la cubeta IV no va registrar variacions en la seva posició (13,25-14 m) durant els dos períodes estudiats (Figura 5.2.B).

- Oxigen dissolt

La figura 5.4.C mostra la distribució espàcio-temporal de la concentració d'oxigen dissolt (en mg l^{-1}) a C-IV durant els dos períodes estudiats. Els valors registrats a l'epilimnion van oscil·lar entre 8 i 12 mg l^{-1} . A la primavera de 1994 va destacar un màxim de 15 mg l^{-1} , associat a una població algal, que va ocupar la major part de l'epilimnion. De la mateixa manera que a C-III, la concentració d'oxigen dissolt disminuïa ràpidament per sota la quimioclina, generant-se una interfase òxico-anòxica que també va registrar un moviment ascendent a mida que avançava l'estiu –de 18 m al mes de maig a 11,75 m a l'octubre– (Figura 5.2.B). A l'inici del període d'estratificació de 1995, la columna d'aigua de C-IV es trobava totalment oxigenada, tot i que en el monolimnion les concentracions de O_2 dissolt mai van superar els 2 mg l^{-1} . Consolidada l'estratificació (juliol), la progressiva difusió del sulfhídric des del sediment va esgotar l'oxigen monolimnionètic i va provocar l'anòxia de la massa d'aigua inferior.

- Concentració de sulfhídric

L'acumulació de sulfhídric a C-IV es produeix únicament durant l'estiu. En aquesta cubeta les concentracions registrades foren sempre inferiors a les de C-III. Aquesta última pot mantenir un monolimnion ric en sulfhídric durant tot l'any degut a la seva meromixi pràcticament permanent. La concentració de sulfhídric al monolimnion de C-IV va augmentar a mida que avançava l'estiu, assolint valors màxims de 100 i 300 $\mu\text{mol l}^{-1}$ durant 1994 i 1995, respectivament (Figura 5.4.C). La presència de ferro dissolt en el monolimnion és la principal causa de les baixes concentracions de H_2S mesurades. Això es degut al desfase temporal entre l'aparició del ferro dissolt i la producció de sulfhídric, que fa que aquest darrer no s'acumuli fins que tot el Fe^{2+} s'ha precipitat en forma de FeS (Garcia-Gil, 1990).

- Penetració de la llum

Les propietats lumíniques de l'epilimnion de C-III són també aplicables al de C-IV (Figura 5.3.B). Les diferències més marcades en l'extinció de la llum es produïren a la part més profunda. Els valors més elevats de η_{met} a C-IV podrien estar relacionats amb una major presència de poblacions algals en el metalimnion d'aquesta cubeta (Taula 5.1).

De manera similar a C-III, a C-IV l'absorció més important de la llum es va donar per sota la quimioclina. En aquest cas, la dràstica extinció de la llum fou deguda a un efecte combinat de l'acumulació de clorofil·les bacterianes i la presència de sulfur de ferro amorf (mackinawita), resultant de la coincidència temporal de dos processos seqüencials: la redissolució de ferro ferrós des del sediment anòxic i la producció de sulfhídric pel bacteris sulfat-reductors. La presència del sulfur de ferro enfosqueix el medi i intensifica l'efecte d'extinció de la llum (Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992).

- Clorofil·la *a*

Durant els dos períodes estudiats no es van detectar comunitats algals importants a C-IV, tot i que en aquesta cubeta és freqüent el desenvolupament de poblacions fitoplanctòniques de fons (Garcia-Gil *et al.*, 1993). Les màximes concentracions de Cl *a* mesurades a C-IV no van sobrepassar mai els 10 µg l⁻¹. Al monimolimnion, sense oxigen ni llum suficient per la fotosíntesi algal, es van mesurar concentracions de Cl *a* d'entre 3 a 6 µg l⁻¹, provinents de cèl·lules algals en procés de sedimentació.

5.2.1.3. Estanyol Coromina

- Temperatura

L'estudi de l'estanyol Coromina es va dur a terme durant el cicle anual de 1994. En aquest període l'estanyol va presentar una dinàmica típica d'un ecosistema holomíctic, amb una estratificació de maig a setembre i una mescla total de la columna d'aigua durant la resta de l'any. La termoclina ocupava tota la columna d'aigua (Figura 5.5.A). Les temperatures durant el període estival van oscil·lar entre 15 i 26°C. A l'hivern, degut als fenòmens de mescla, la temperatura de la columna d'aigua es va mantenir homogènia (5 i 6°C).

- Conductivitat

La distribució espàcio-temporal de la conductivitat es mostra en la figura 5.5.B. Malgrat que l'estanyol es pot catalogar com holomíctic, amb un únic episodi de mescla a l'hivern, durant el cicle estudiat es va establir un gradient de conductivitat creixent al apropar-se al sediment. Aquest gradient, encara que suau, va mantenir una capa d'aigua més conductora (800-900 µS cm⁻¹) en el fons de l'estanyol (Figura 5.5.B, àrea ombrejada). Situacions similars han estat descrites anteriorment en l'estanyol (Borrego i Garcia-Gil, 1994). La presència d'aquesta estratificació química fou conseqüència tant de l'elevada quantitat de substàncies orgàniques com de la intensa activitat de descomposició microbiana al sediment. En el Coromina es pot parlar doncs d'una *meromixi biogènica*, mentre que la de l'estany és de tipus crenogènic. Aquest gradient químic suau condiciona el tipus de comunitat bacteriana fotosintètica que es desenvolupa a l'estanyol (Abella i Garcia-Gil, 1988; Borrego i Garcia-Gil, 1994).

- Oxigen dissolt

La concentració d'oxigen dissolt va mostrar variacions dràstiques, oscil·lant des de períodes de sobresaturació (>200 %) fins a episodis d'anòxia a pràcticament tota la columna d'aigua (Figura 5.5.C). Aquestes fluctuacions extremes en la concentració

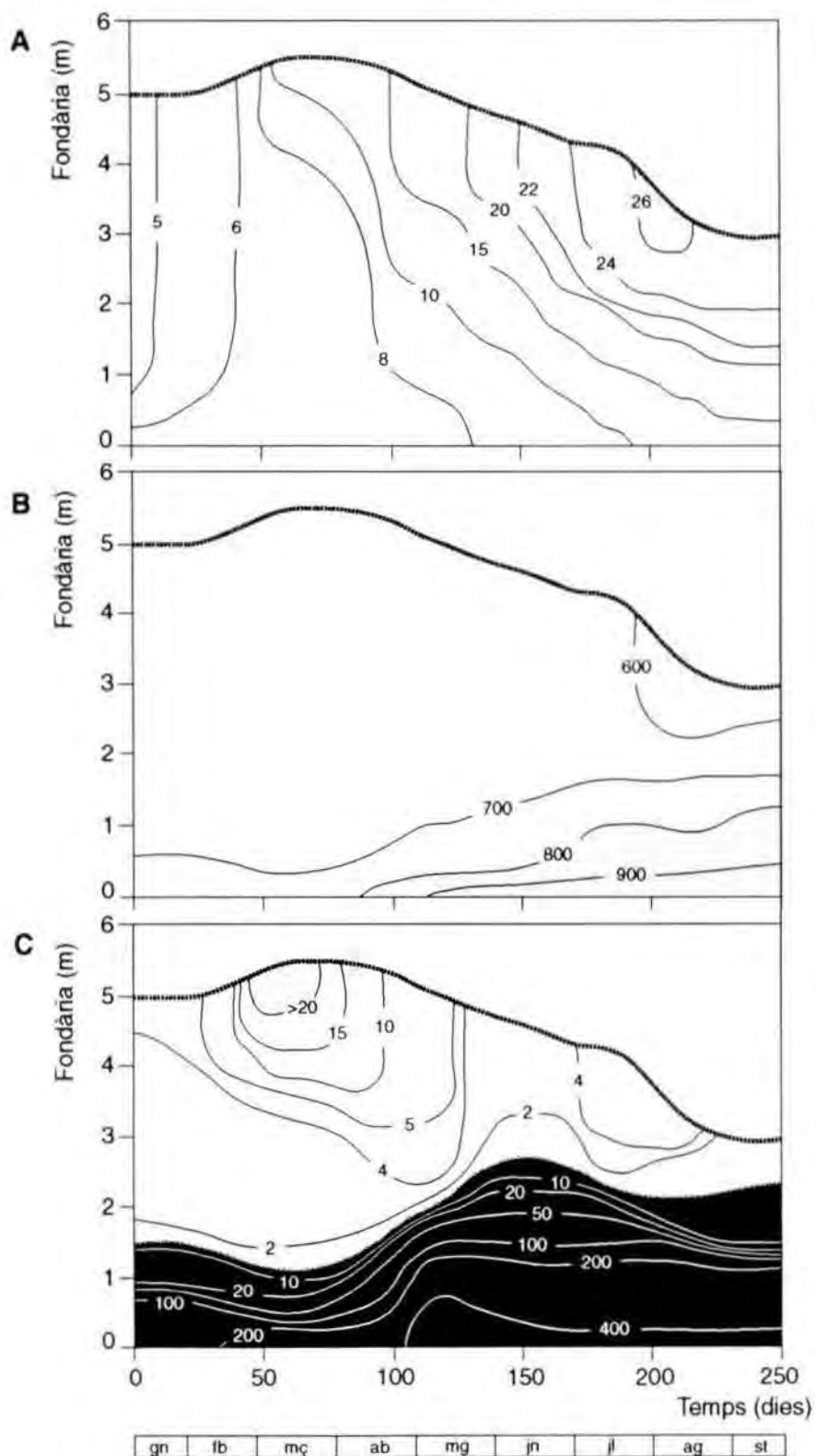


Figura 5.5. Distribució espàcio-temporal de (A) la temperatura (en °C), (B) la conductivitat (en $\mu\text{S cm}^{-1}$) i (C) la concentració d'oxigen dissolt (en mg l^{-1}) i la concentració de sulfhídric (línia blanca, en $\mu\text{mol l}^{-1}$) a l'estanyol Coromina durant els dos períodes d'estratificació estudiats.

Figure 5.5. Time-depth distribution of (A) temperature (in °C), (B) conductivity (in $\mu\text{S cm}^{-1}$) and (C) dissolved oxygen (in mg l^{-1}) and sulfide concentrations (white line, in $\mu\text{mol l}^{-1}$) in Coromina lagoon during the study period.

d'oxigen són característics d'ecosistemes hipereutròfics (Barica, 1979; Henderson-Sellers i Markland, 1987) i ja han estat descrites amb anterioritat en aquest estanyol (Borrego i Garcia-Gil, 1994). El màxim temporal d'oxigen ($>20 \text{ mg l}^{-1}$) localitzat a la primavera fou degut a l'activitat fotosintètica d'una comunitat algal desenvolupada en aquesta zona (Figura 5.6).

La columna d'aigua es va mantenir oxigenada fins al començament de l'estratificació tèrmica al mes de maig. A partir d'aleshores, l'elevada quantitat de matèria orgànica acumulada al sediment va provocar l'esgotament de l'oxigen hipolimnètic en processos oxidatius. L'anòxia de massa d'aigua inferior es va mantenir durant la resta del període estudiat. Durant l'estiu, els màxims valors d'oxigen dissolt mesurats en l'epilimnion no van superar els 4 mg l^{-1} .

- Concentració de sulfhídric

Les concentracions d'aquest compost no foren tant elevades ($400 \mu\text{mol l}^{-1}$) com les registrades en les cubetes degut, en part, a la manca d'una entrada d'aigua surgent rica en sulfats. Abella (1980) va descriure un esgotament total de sulfats en l'hipolimnion com a conseqüència de l'activitat sulfat-reductora. A diferència de les cubetes i d'altres estanyols surgents del sistema lacustre de Banyoles, en el Coromina el sulfat es pot considerar com el factor limitant. El sulfhídric es va acumular en la massa d'aigua inferior i durant l'hivern va ser detectable fins a la superfície degut a la mescla de la columna d'aigua (Figura 5.5.C).

- Penetració de la llum

A l'estanyol Coromina, l'extinció vertical de la llum fou més intensa que a les cubetes de l'Estany (Figura 5.3.C). Durant el mes de març, la principal causa d'absorció de la llum fou la presència en el primer metre d'una densa comunitat algal. Durant aquest període la llum s'esgotava en els dos primers metres amb uns coeficients d'extinció molt elevats (Taula 5.1). Al mes de setembre, degut a la desaparició del filtre algal, la llum va penetrar fins a 2 m de fondària tot i que a partir d'aquí s'extingia ràpidament a causa de la presència d'una comunitat de bacteris fotosintètics del sofre ($\eta_{met} = 6,6$).

- Clorofil·la *a*

La distribució espàcio-temporal de la concentració de Cl *a* al Coromina fou molt similar a la de l'oxigen dissolt, presentant màxims accentuats durant la primavera de 1994 que van desaparèixer totalment durant la fase final de l'estratificació (Figura 5.6). Durant la primera fase de l'estudi, els valors de concentració obtinguts amb l'espectrofotòmetre (Figura 5.6.A) foren similars als obtinguts per HPLC (Figura 5.6.B) ja que durant aquest període no es van detectar interferències de la Cl *a* amb clorofil·les bacterianes. La comunitat fitoplànctònica present durant els mesos de març-abril va assolir concentracions de Cl *a* de fins a $200 \mu\text{g l}^{-1}$. L'activitat fotosintètica d'aquesta comunitat, constituïda bàsicament per clorofícies (*Chlamydomonas* spp. i *Chlorella* spp.), diatomees (principalment *Cyclotella* spp.) i euglenòfits (*Euglena* spp.), fou la responsable dels màxims d'oxigen mesurats durant aquest període (Figura 5.5.C).

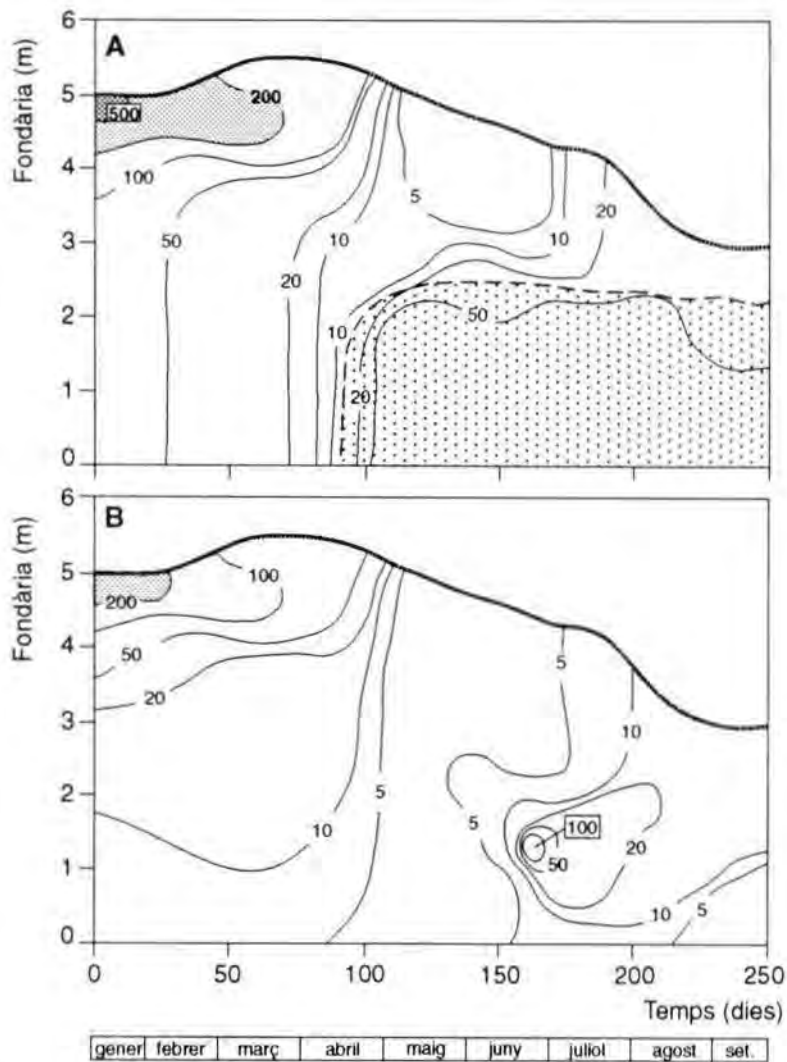


Figura 5.6. Distribució espàcio-temporal de la concentració de $Chl a$ (en $\mu g l^{-1}$) a l'estanyol Coromina mesurada amb (A) i (B) amb HPLC (B) durant el període estudiat.

Figure 5.6. Time-depth distribution of $Chl a$ concentration (in $\mu g l^{-1}$) in Coromina lagoon measured (A) by spectrophotometry and (B) by HPLC during the study period.

Un fet destacable fou la presència d'un màxim hipolimnètic de $Chl a$ de $100 \mu g l^{-1}$ durant els mesos de juny-juliol. Atès que en aquesta zona de la columna d'aigua les concentracions de sulfhídric foren de l'ordre dels $100 \mu mol l^{-1}$ és difícil atribuir aquest màxim de $Chl a$ a una comunitat algal de fons. A més, en l'observació microscòpica de les mostres no es va advertir la presència de cèl.lules algals que justificuessin el màxim de $Chl a$. Aquest, d'altra banda, va coincidir tant espacialment com temporalment amb els màxims de $BChl c$ i d associats a les poblacions de "*Chlorochromatium aggregatum*" i *Pelodictyon clathratiforme*, respectivament (veure figura 5.17). Això suggereix una relació estreta entre aquestes poblacions i la $Chl a$, que podria tenir a veure amb la composició pigmentària dels centres de reacció dels bacteris verds del sofre on l'acceptor primari d'electrons és una molècula de $Chl a$ ($BChl-663$) (van de Meent *et al.*, 1992; Feiler *et al.*, 1994; Feiler i Hauska, 1995). Malgrat tot, aquest origen no és clar atès les elevades concentracions de $Chl a$ detectades.

5.2.1.4. Altres

S'inclouen dins d'aquest apartat tots aquells llacs i estanyols que no formen part del sistema lacustre de Banyoles i que van ser mostrejats ocasionalment. Aquests ecosistemes es divideixen en tres grans grups: i) llacunes costaneres de Mallorca, ii) llacs centreuropeus (Buchensee, Schleinsee, Höllerersee i Langsee) i, iii) llacs nord-americans (Baker, Cassidy, Jones, Lefevre, Little Mill, Mud, Paul, Peter, Round, Warner i Wintergreen a l'estat de Michigan, i Crystal, Fish, Little Long, Little Silver, Mary, Minocqua, Mirror, Silver, Sparkling, Trout Bog i Wood a l'estat de Wisconsin).

- Llacunes costaneres de Mallorca

Es van mostrejar la llacuna d'Es Cibollar a l'albufera d'Alcudia i Es Gorg de Canyamel, una llacuna propera a la badia d'Artà. Ambdues llacunes són meromíctiques degut a la intrusió d'aigua marina pel seu fons (Moyà et al., 1987; Martínez-Taberner et al., 1987). En ambdós casos es va observar una termoclina invertida ja que la temperatura del monimolimnia (24 i 17 °C a Es Cibollar i Es Gorg, respectivament) fou superior a la dels respectius mixolimnia (15 °C en ambdós llacunes). A Es Cibollar el gradient químic va passar des de 7 mS cm⁻¹ en la superfície a 35 mS cm⁻¹ en el monimolimnion tot i que la quimioclina no fou brusca. A Es Gorg de Canyamel, els valors de conductivitat al monimolimnion foren inferiors (14 mS cm⁻¹).

En ambdues llacunes, l'hipolimnion era anòxic amb concentracions màximes de sulfhídric de 200 µmol l⁻¹ i 500 µmol l⁻¹ a Es Cibollar i Es Gorg, respectivament. La interfase O₂/H₂S es va localitzar al voltant de 4 m de fondària en ambdues llacunes.

- Llacs centreuropeus

Tots ells llacs centreuropeus són holomíctics, amb una període de mescla total de la columna d'aigua durant l'hivern, i presenten una topologia similar. El seu estat tròfic és divers, depenent de l'entrada de nutrients per les corresponents conques de recepció però com a norma general tots ells són mesotròfics. Donat que l'estudi es va realitzar durant el mes d'agost (1993) en tots els casos es va observar una estratificació tèrmica consolidada i un gradient químic suau o absent (Taula 5.2). Els valors de conductivitat de l'epilimnion oscil·laven entre 200 i 400 µS cm⁻¹ mentre que en l'hipolimnion es trobaven al voltant de 600 µS cm⁻¹ (Schleinsee, Höllerersee i Längsee) i 1000 µS cm⁻¹ (Buchensee). Únicament en aquest darrer cas es podria parlar d'una certa estratificació química de la columna d'aigua.

En tots els casos, l'hipolimnion era anòxic amb concentracions màximes de sulfhídric que oscil·laven entre 60 µmol l⁻¹ (Schleinsee) i 300 µmol l⁻¹ (Buchensee). Malgrat les diferències en la localització de la interfase O₂/H₂S, sempre es van trobar poblacions de bacteris fotosintètics, normalment Cromatiàcies i bacteris verds del sofre, associades a aquestes zones (Taula 5.2).

Taula 5.2. Principals característiques físico-químiques dels llacs centreeuropeus i nord-americans estudiats.**Table 5.2.** Main physical and chemical characteristics of the studied centereuropean and U.S. lakes.

Llac	Fondària (m)	Termoclina (m)	Oxiclina (m)	O ₂ /H ₂ S (m)	[H ₂ S]max (μmol l ⁻¹)	Màxim Crm ^a (m)	PAR ^b (%)	Màxim Bvs ^a (m)	PAR (%)
Centreeuropa									
Schleinsee	10	3-7	3,5-5,5	5,5	60	6	0,002	6,5	0,0005
Buchensee	11	3-7	5-8	8	309	7,5	0,047	8	0,02
Höllerersee	20	3-11	6-9	9,5	196	10	0,07	10,5	0,004
Längsee	21	7-10	9-10	10,5	168	10,75	0,06	11	0,007
Michigan									
Wintergreen	6,5	3-6	1,5-3	4	221	4,25	0,16	5	0,016
Round	6,5	2-6	2-4,5	5	128	-	-	5	0,04
Mud	8	2,5-6	1-3	3,5	16	-	-	4	0,08
Baker	8	2-6	2-4	5,5	36	5	0,09	5-6	0,025
Jones	10	2-7	1-3	6,5	27	-	-	3-5	0,14
Cassidy	10,5	3-7	5-8	7,25	61	-	-	6,5	0,013
Little Mill	10,5	3-8	5-9	8,25	97	9	0,02	9,5	0,005
Paul	11	4-6	3-5	6	32	-	-	7	0,017
Lefevre	15	2-6	6-8	12,25	9	13	0,03	13,5	0,016
Warner	16	4-10	2-10	12	90	12,25	0,03	12,5	0,014
Peter	16,5	4-10	4,5-6	8	33	-	-	9,5	0,062
Wisconsin									
Trout Bog	7	0-4	1-2	2,25	36	-	-	3	0,16
Little Long	8	3-6	3,5-4	4,5	119	4,25	0,4	4,5	0,045
Silver Nord	8	6-8	6-6,5	6,25	231	6,5	0,47	7	0,35
Minocqua	12	7-10	5-8	8,25	11	-	-	11	0,03
Mirror	13	3,5-9	4,5-7	7,5	138	7,25	0,09	7,5	0,026
Crystal	13	7-10	7-9	10,25	140	12	0,12	12	0,12
Silver	14	6-12	7-9	11	129	12,25	0,03	12,5	0,015
Wood	15	6-12	8-12	12,25	100	13	0,18	13	0,18
Fish	17	4-9	2-5	10,5	21	-	-	11	0,18
Mary	18,5	1-5	1-2	2,25	44	-	-	3,5	0,17
Sparkling	18,5	7,5-12,5	10,5-15	15,25	40	16	0,03	18	0,07

^a: Crm: Cromatiàcies; Bvs: Bacteris verds del sofre. ^b: PAR: Radiació fotosintèticament activa, mesurada com el % de la llum incident en superfície.

^a: Crm: Chromatiaceae; Bvs: Green Sulfur Bacteria. ^b: PAR: Photosynthetic Active Radiation, measured as % of the incident light.

- Llacs nord-americans

En general, tots els llacs presentaven termoclines i oxiclins molt amples, que oscil·laven entre 2 i 6 m de gruix les primeres, i entre 1 i 4 m les segones (Taula 5.2). Tots els hipolimnia eren anòxics en el moment del mostreig però les concentracions de sulfhídric foren molt inferiors a les mesurades en els llacs europeus o en els del sistema lacustre de Banyoles. Les màximes concentracions, sempre en les zones més profundes de la columna d'aigua, foren de 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ tot i que en la majoria de llacs rarament superaven els 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Això generava interfases òxico-anòxiques poc definides, sempre lligades a un gradient físico-químic suau. En la majoria dels casos la comunitat fotosintètica bacteriana es trobava per immediatament sota la interfase $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$.

5.2.2. Identificació de les poblacions de bacteris fotosintètics predominants als ecosistemes estudiats

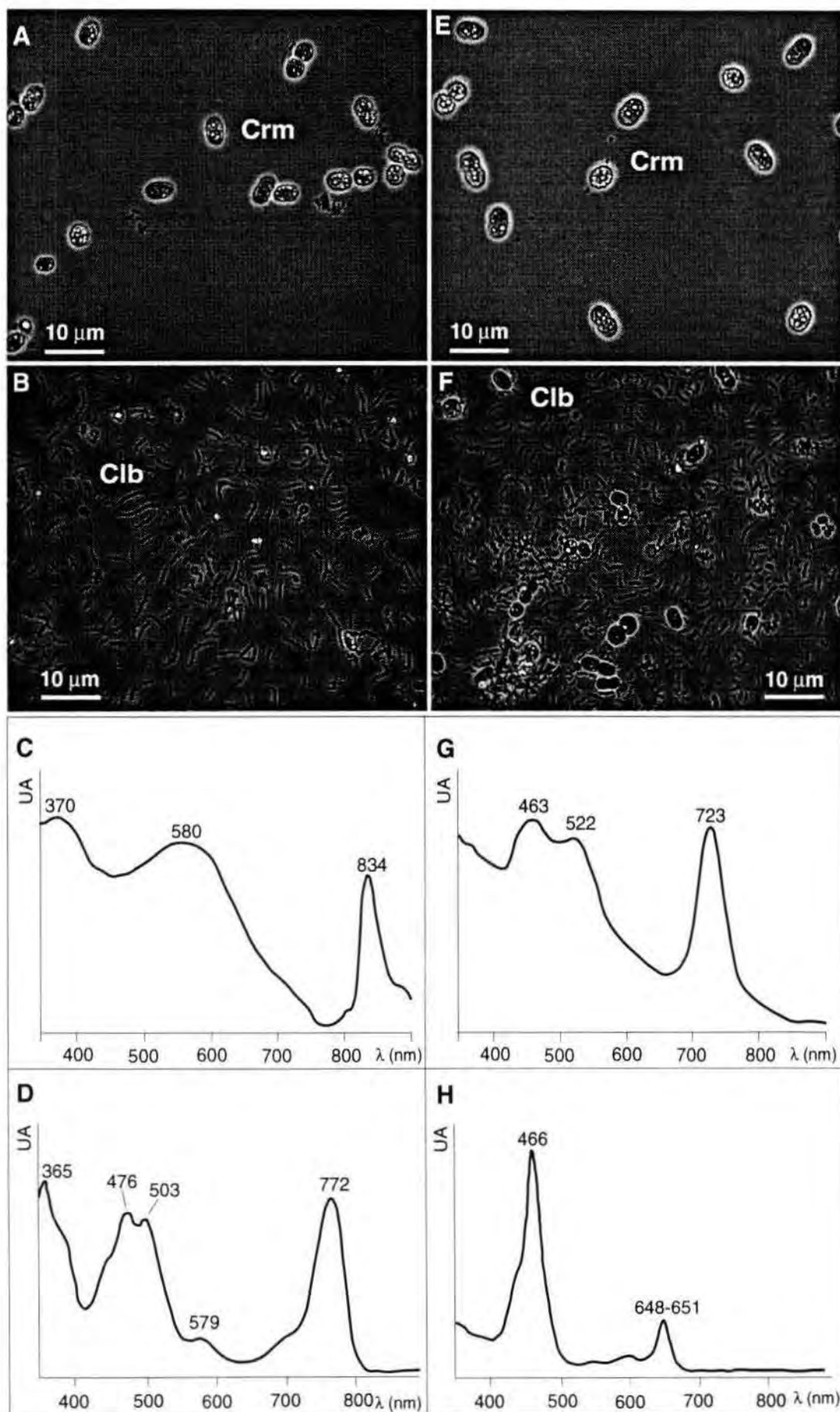
5.2.2.1. Cubeta III i IV

Les comunitats bacterianes fotosintètiques estudiades a C-III i C-IV estaven constituïdes per representants dels bacteris vermells (Cromatiàcies) i verds del sofre. *Chromatium minus* fou identificat com el principal representant dels primers i *Chlorobium phaeobacteroides* dels segons (Figura 5.7).

Chromatium minus és un bacteri de forma bacilar, esfèrica o ovoidal, d'aproximadament 2 μm de diàmetre i de 2,5 a 6 μm de llargada, amb flagel·lació polar i coloració rosada o vermellova (Kondratieva *et al.*, 1992). A més de *Chromatium minus*, es van observar puntualment altres Cromatiàcies, com ara *C. okenii*. Tot i això, la seva presència fou sempre testimonial i la seva contribució a la biomassa de la comunitat mai va ser relevant.

L'altra població dominant fou la de *Chlorobium phaeobacteroides*. Aquesta espècie marró pertanyent al grup dels bacteris verds del sofre, té forma bacil·lar, recte o lleugerament curvada, de 0,6 a 0,8 μm de diàmetre i de 1,3 a 2,7 μm de llargada (Kondratieva *et al.*, 1992).

Pel que fa als pigments fotosintètics, es van identificar dos tipus de bacterioclòrilles (*a* i *e*) i dos carotens (l'okenona i l'isorenieratè). La BCl *a* i l'Okn són els principals pigments fotosintètics de *Chromatium minus*, fàcilment identificables espectrofotomètricament gràcies als seus màxims d'absorció en solvents orgànics – 365, 578 i 772 nm per la BCl *a* i 490 nm per l'Okn, en acetona– (Figura 5.7). D'altra banda, la BCl *e* i l'Isr són els principals pigments de les espècies marrons i presenten màxims en acetona a 467, 604 i 648 nm per la BCl *e* i 425, 453 i 485 nm per l'Isr.



5.2.2.2. Estanyol Coromina

A diferència de les cubetes de l'estany, la comunitat fotosintètica bacteriana desenvolupada a l'estanyol Coromina va estar dominada per *Pelodictyon clathratiforme* i el consorci "Chlorochromatium aggregatum" (Figura 5.8).

Pelodictyon clathratiforme és una espècie verda dels bacteris verds del sofre. Les cèl·lules són bacilars, de 0,7 a 1,2 µm d'amplada i de 1,5 a 2,5 µm de llargada (Kondratieva *et al.*, 1992). *P. clathratiforme* és de color verd brillant i es caracteritza per posseir vacúols de gas i divisió ternària. Això li permet formar agrupacions en forma de xarxa tridimensional (Pfennig i Cohen-Bazire, 1967).

Per la seva banda, "Chlorochromatium aggregatum" és un consorci en forma de barril consistent en un bacteri amb forma bacilar, incolor i amb flagelació polar envoltat per un nombre variable de bacteris verds (Kondratieva *et al.*, 1992). Aquests darrers són morfològicament semblants a *Chlorobium limicola* (Trüper i Pfennig, 1971). Pel que fa al bacteri central del consorci, s'ha especulat que sigui un bacteri sulfat reductor o un fermentador tot i que aquest extrem no s'ha demostrat degut a que ha estat impossible aïllar-lo en cultiu pur (Pfennig, 1980). La mida del consorci és variable, variant des de 2,5 a 4,0 µm d'amplada i de 4 a 10 µm de llargada. Poblacions naturals d'aquest consorci són freqüents en el metalimnion de llacs meromíctics d'arreu del món (Caldwell i Tiedje, 1975; Croome i Tyler, 1984)

Malgrat que els bacteris identificats pertanyen ambdós a les espècies verdes dels bacteris verds del sofre, els pigments identificats foren dos tipus diferents de bacterioclorofil·les (*c* i *d*) i un únic tipus de carotè (clorobactè). La BCl *d* es va associar a *Pelodictyon clathratiforme* i la BCl *c* a "Chlorochromatium aggregatum" tot i que, en aquest darrer cas, no es pot descartar que també posseís BCl *d* ja que les poblacions d'aquest consorci desenvolupades als llacs nord-americans posseïen aquest darrer pigment (veure apartat 5.2.4.1). La presència simultània de BCl *c* i BCl *d* en mostres naturals només és discriminable utilitzant HPLC degut a les similituds espectrals entre ambdues bacterioclorofil·les, amb màxims d'absorció en acetona a 434 i 667 nm per la BCl *c*, i a 408, 427 i 654 nm per la BCl *d* (Figura 5.8). D'altra banda, el clorobactè és fàcilment distingible degut als seus màxims a 435, 462 i 496 nm.

Figura 5.7. Pàgina anterior. Micrografies al microscopi òptic de contrast de fase de la comunitat bacteriana fotosintètica desenvolupada a C-III (A, B) i C-IV (E, F). En ambdós casos, la comunitat estava constituïda per *Chromatium minus* (Crm) i *Chlorobium phaeobacteroides* (Clb). (C, D) Espectres d'absorció *in vivo* (C) i en acetona (D) de *Chromatium minus*, amb BCl *a* i Okn. (G, H) Espectres d'absorció *in vivo* (G) i en acetona (H) de la població de *Chlorobium phaeobacteroides*, amb BCl *e* i Isr.

Figure 5.7. Facing page. Phase contrast micrograph of the photosynthetic bacterial community of C-III (A, B) and C-IV (E, F). In both basins the community was composed by *Chromatium minus* (Crm) and *Chlorobium phaeobacteroides* (Clb). (C, D). In vivo absorption spectra (C) and acetonc pigment extract (D) of natural samples of *Chromatium minus* showing the typical absorption maxima of BCl *a* and Okn. (G, H) In vivo absorption spectra (G) and acetonc pigment extract (H) of natural samples of *Chlorobium phaeobacteroides* population showing the typical absorption maxima of BCl *e* and Isr.

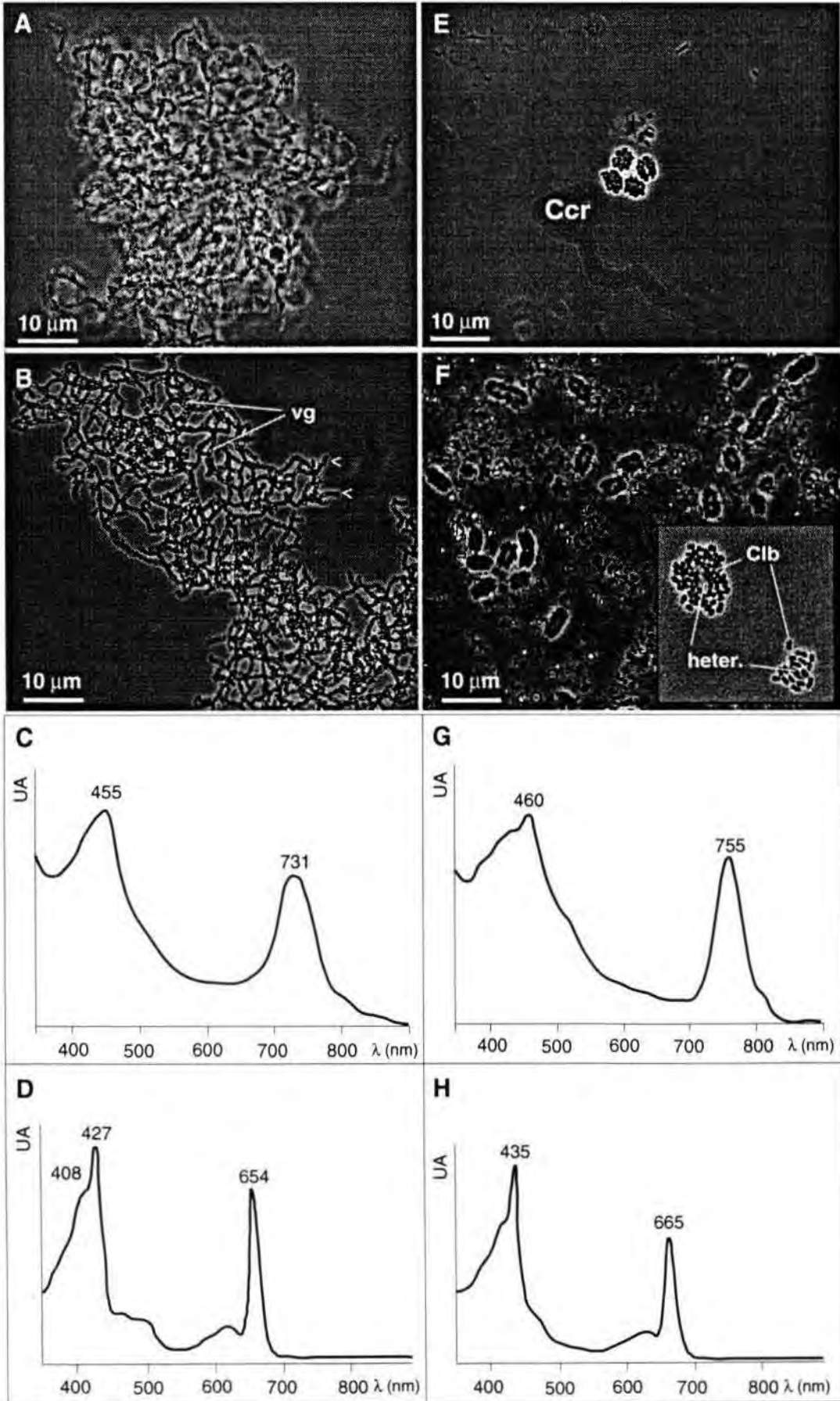


Figura 5.8. Pàgina anterior. Microfotografies al microscopi òptic de contrast de fase de la comunitat bacteriana fotosintètica desenvolupada a l'estanyol Coromina. La comunitat estava composta per *Pelodictyon clathratiforme* i "Chlorochromatium aggregatum". (A) Estructura tridimensional, en forma de xarxa, de les colònies de *Pelodictyon*. (B) Visió en dues dimensions de la colònia de *Pelodictyon* on s'observa en detall la divisió ternària de les cèl.lules (fletxes) i els vacúols de gas (vg). (C, D) Espectres d'absorció *in vivo* (C) i en acetona (D) d'una mostra natural de *Pelodictyon clathratiforme*, amb BCl d i Cbt. (E, F) Consorcis de "Chlorochromatium aggregatum" on s'observa la disposició de les cèl.lules de *Chlorobium* al voltant d'un bacteri central, suposadament heterotròf. (G, H) Espectres d'absorció *in vivo* (G) i en acetona (H) de la població de "Chlorochromatium aggregatum", amb BCl c i Cbt.

Figure 5.8. Facing page. Phase contrast micrograph of the photosynthetic bacterial community developed in Coromina lagoon. In this case, the community was composed of *Pelodictyon clathratiforme* and "Chlorochromatium aggregatum". (A) Three dimensional structure of a net-like colony of *Pelodictyon*. (B) Two dimensional view of a net, where the ternary division (arrows) characteristic of *Pelodictyon* cells, as well as gas vacuoles (vg), are shown. (C, D). In vivo absorption spectra (C) and acetonetic pigment extract (D) of natural samples of *Pelodictyon clathratiforme* showing the typical absorption maxima of BCl d and Cbt. (E, F) "Chlorochromatium aggregatum" consortia, showing the distribution of *Chlorobium* cells around the central heterotrophic-motile bacterium. (G, H) In vivo absorption spectra (G) and acetonetic pigment extract (H) of "Chlorochromatium aggregatum" where the absorption maxima of BCl c and Cbt are shown.

5.2.2.3. Altres

- LLacunes costaneres de Mallorca

La comunitat bacteriana fotosintètica desenvolupada a Es Cibollar va estar composta per Cromatiàcies (*Chromatium minus*) i espècies marrons dels bacteris verds del sofre (*Chlorobium phaeovibrioides* i *Pelodictyon phaeum*, ambdues espècies freqüents en ambients salins). El mixolimnion estava dominat per cianobacteris (*Syneccoccus* spp.). A Es Gorg de Canyamel, en canvi, la comunitat bacteriana estava formada únicament per espècies marrons (*Chlorobium phaeovibrioides*).

- Llacs centreuropeus i nord-americans

En la majoria dels llacs estudiats la comunitat bacteriana fotosintètica presentava una elevada diversitat i complexitat. Les principals diferències respecte les cubetes III i IV de l'estany de Banyoles foren en primer lloc, la presència de cianobacteris, constituïnt importants poblacions metalimnètiques (Långsee i la majoria de llacs dels EEUU) i, en segon, la presència d'espècies mòbils, ja fos lligada a flagels o a vacúols de gas, de Cromatiàcies i bacteris verds del sofre. La presència d'aquestes espècies en llacs holomíctics és freqüent i s'ha interpretat com una adaptació a l'existència de gradients físico-químics suaus en la columna d'aigua (Abella i Garcia-Gil, 1988). La composició i abundància de les diferents poblacions depèn de les característiques físico-químiques de l'ecosistema estudiat (Taula 5.3). Els principals representants observats en les diferents comunitats pertanyien als generes *Chromatium*, *Lamprocystis*, *Amoebobacter*, *Thiodictyon*, *Thiocystis*, *Thiopedia* per part de les Cromatiàcies i *Ancalochloris* spp., *Pelodictyon* (verd o marró), *Chloronema* i els consorcis "Chlorochromatium aggregatum" (verd) i "Pelochromatium roseum" (marró) per part dels bacteris verds (Figura 5.9).

Taula 5.3. Composició i abundància de les diferents poblacions que integren la comunitat microbiana fotosintètica dels llacs centreeuropeus i americans estudiats. (-) no detectat; (+) $\leq 100 \mu\text{g l}^{-1}$; (++) 100–200 $\mu\text{g l}^{-1}$; (+++) $\geq 200 \mu\text{g l}^{-1}$.

Table 5.3. Composition and abundance of the different populations that form the photosynthetic microbial community in the studied centereuropean and north-american lakes. (-) not detected; (+) $\leq 100 \mu\text{g l}^{-1}$; (++) 100–200 $\mu\text{g l}^{-1}$; (+++) $\geq 200 \mu\text{g l}^{-1}$.

Llac	Fitoplàncton ^a	Cromatiàcies ^b	Bacteris verds del sofre ^c		Pigments				
			verds	marrons	Cl a	BCl a	BCl c	BCl d	BCl e
Centreeuropa									
Buchensee	Clf	Amb, Crm, Lmp	Cln	Plp	+	++	-	+	+
Schleinsee	Clf	Amb, Lmp, Thp	Cln	Plp	++	+++	-	++	++
Höllerersee	Clf, Crp, Dia	Crn, Lmp	-	Plp	+	+++	-	-	+
Längsee	Cnb, Clf	Crn, Lmp	-	Plp	+	++	-	-	+
Michigan									
Wintergreen	Clf, Cnb	Crn, Lmp, Thp	Anc, Cln	-	++	+++	-	+++	-
Round	Clf, Cnb	-	Cln, Ccr, Plc	-	+	-	+	+++	-
Mud	Clf, Cnb	-	Anc, Cln, Plc	-	+	-	+	+	-
Baker	Cnb, Clf	Thc, Lmp	Cln, Ccr, Plc	-	+	+	+	++	-
Jones	Clf, Cnb	-	Cln, Ccr, Plc	-	++	-	-	++	-
Cassidy	Cnb	-	Cln, Ccr	Plp	+	-	-	++	+
Little Mill	Clf, Cnb	Thd, Lmp	Cln, Ccr, Plc	Pcr	++	+	-	+	+
Paul	Clf	-	Cln, Ccr, Clb	Plp	++	-	++	+++	+
Lefevre	Clf	Lmp, Thp	-	Pcr, Plp	+	+	-	-	+
Warner	Clf, Cnb	Thd, Thp	-	Plp	+	+	-	-	+
Peter	Clf, Cnb	-	Cln, Ccr	Plp	+	-	+	+++	+
Wisconsin									
Trout Bog	Clf	-	Clb, Ccr	-	+	-	+	+	-
Little Long	Clf, Cnb	Crn, Lmp, Thc	Cln, Ccr	Pcr, Plp	++	+	+	+++	+++
Silver Nord	Cnb, Clf	Crn, Thd, Thp	Cln, Ccr, Plc	Pcr, Plp	+	++	+	++	++
Minocqua	Cnb	-	Cln, Ccr	Pcr, Plp	+	-	-	+	+
Mirror	Clf	Thd, Thp	Ccr	Pcr	+	+	+	+++	++
Crystal	Cnb, Clf	Crn, Lmp, Thc	-	Pcr, Plp	+	+	-	-	++
Silver	Clf, Cnb	Crn, Lmp, Thc, Thp	-	Plp	+	++	-	-	+
Wood	Clf, Cnb	Thd, Thp	-	Plp	+	+	-	-	+
Fish	Cnb, Clf	-	Cln, Ccr, Plc	Plc	+	-	-	+	+
Mary	Clf	-	Cln, Ccr	-	++	-	+	++	-
Sparkling	Clf	Thd, Lmp	Cln, Ccr	Plp	+	+	+	+	+

^a Clf: Clorofícies; Crp: Criptofícies; Dia: Diatomees; Cnb: Cianobacteris. ^b Crm: Chromatium; Lmp: Lamprocystis; Amb: Amoebobacter; Thc: Thiocystis; Thd: Thiodictyon; Thp: Thiopedia. ^c Cln: Chloronema; Clb: Chlorobium; Ccr: "Chlorochromatium aggregatum"; Plc: Pelodictyon clathratiforme; Anc: Ancalochloris; Pcr: "Pelochromatium roseum"; Plp: P. phaeoclathratiforme.

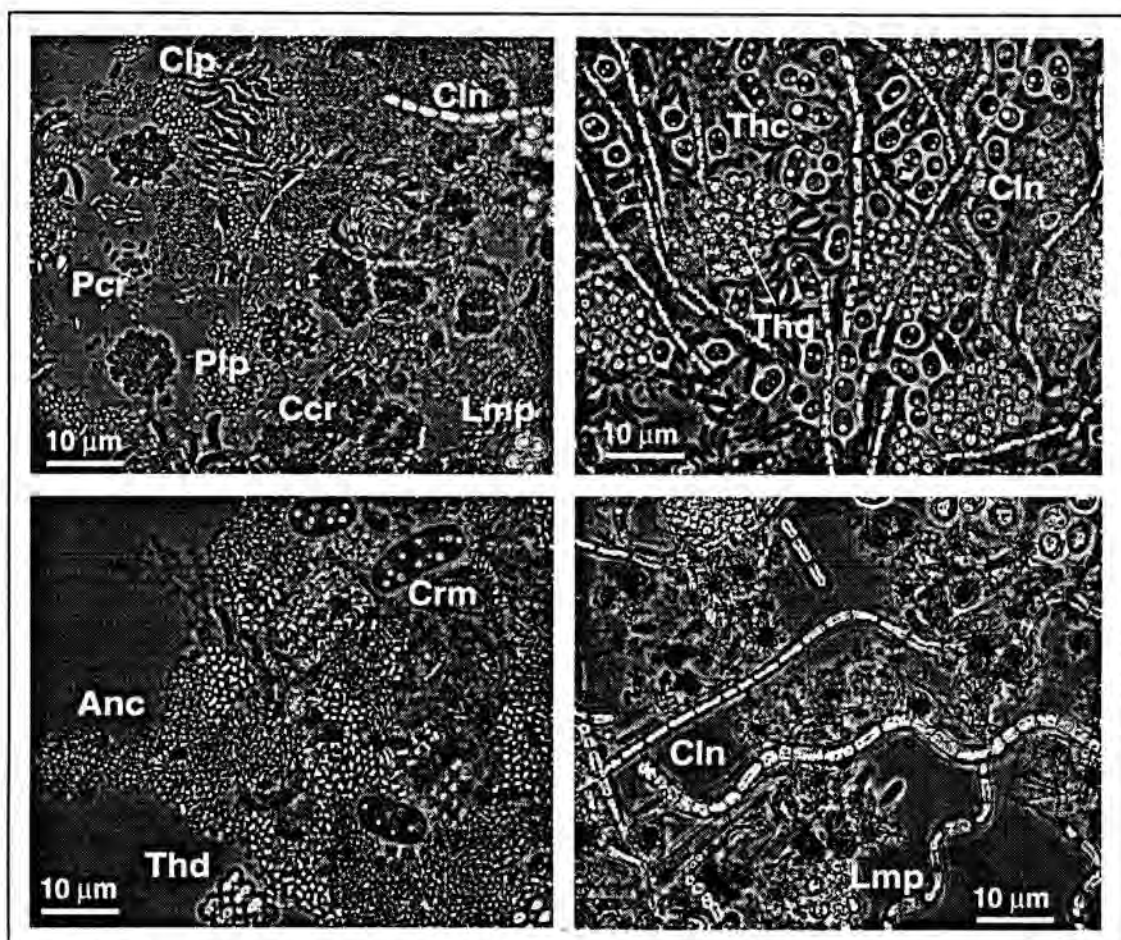


Figura 5.9. Microfotografies al microscopi òptic de contrast de fase de les comunitats bacterianes fotosintètiques desenvolupades en alguns dels llacs estudiats. (A) Llac Round: "Chlorochromatium aggregatum" (Ccr), "Pelochromatium roseum" (Pcr), *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (Plp), *Chloronema* (Cln) i "*Chloroplana vacuolata*" (Clp). (B) Llac Little Long: *Thiocystis* (Thc), *Lamprocystis* (Lmp) i *Chloronema* (Cln). (C) Llac Wintergreen: *Chromatium okenii* (Crm), *Thioldictyon* (Thd) i *Ancalochloris* spp. (Anc). (D) Llac Baker: *Chloronema* (Cln) i *Lamprocystis* (Lmp).

Figure 5.9. Phase contrast micrographs of photosynthetic bacterial communities developed in some of the studied lakes. (A) Round lake: "*Chlorochromatium aggregatum*" (Ccr), "*Pelochromatium roseum*" (Pcr), *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (Plp), *Chloronema* (Cln), and "*Chloroplana vacuolata*" (Clp). (B) Little Long lake: *Thiocystis* (Thc), *Lamprocystis* (Lmp), and *Chloronema* (Cln). (C) Wintergreen lake: *Chromatium okenii* (Crm), *Thioldictyon* (Thd), and *Ancalochloris* spp. (Anc). (D) Baker lake: *Chloronema* (Cln) and *Lamprocystis* (Lmp).

5.2.3. Dinàmica espàcio-temporal del contingut en pigments antena

Tant a C-III com a C-IV la comunitat bacteriana fotosintètica va dominar la zona de gradient i les aigües anòxiques de la columna d'aigua durant la major part de l'any. Tant el desenvolupament com la distribució van estar fortament determinats per les propietats físico-químiques prevalents en cada moment de l'estudi.

5.2.3.1. Cubeta III

- Bacterioclorofil·la *a*

La densitat poblacional dels bacteris vermells del sofre en la cubeta III es troba sovint restringida per la fondària a la què es localitza la interfase O_2/H_2S , la qual cosa determina la intensitat de llum que arriba a les fondàries amb sulfhídric

(Borrego *et al.*, 1993; Garcia-Gil *et al.*, 1996). Una localització menys profunda de la interfase òxico-anòxica (entre 16 i 20 m) facilita la presència de densitats importants de Cromatiàcies en aquesta cubeta (Abella, 1980).

L'any 1994 la població de *Chromatium minus* estava localitzada inicialment a 18,5 m de fondària, amb concentracions de BCl *a* de 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 5.10.A). A mida que avançava el període d'estratificació, es va anar desplaçant cap amunt, seguint la dinàmica de la interfase $\text{O}_2/\text{H}_2\text{S}$ (Figura 5.2). Els màxims poblacionals durant 1994 es van trobar a l'etapa final de l'estudi, on es van mesurar concentracions de fins a 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ de BCl *a*. Aquest increment en les concentracions de BCl *a* reflecteix l'increment de la intensitat de llum que arribava a la població en assolir aquestes fondàries més superficials (16-17 m).

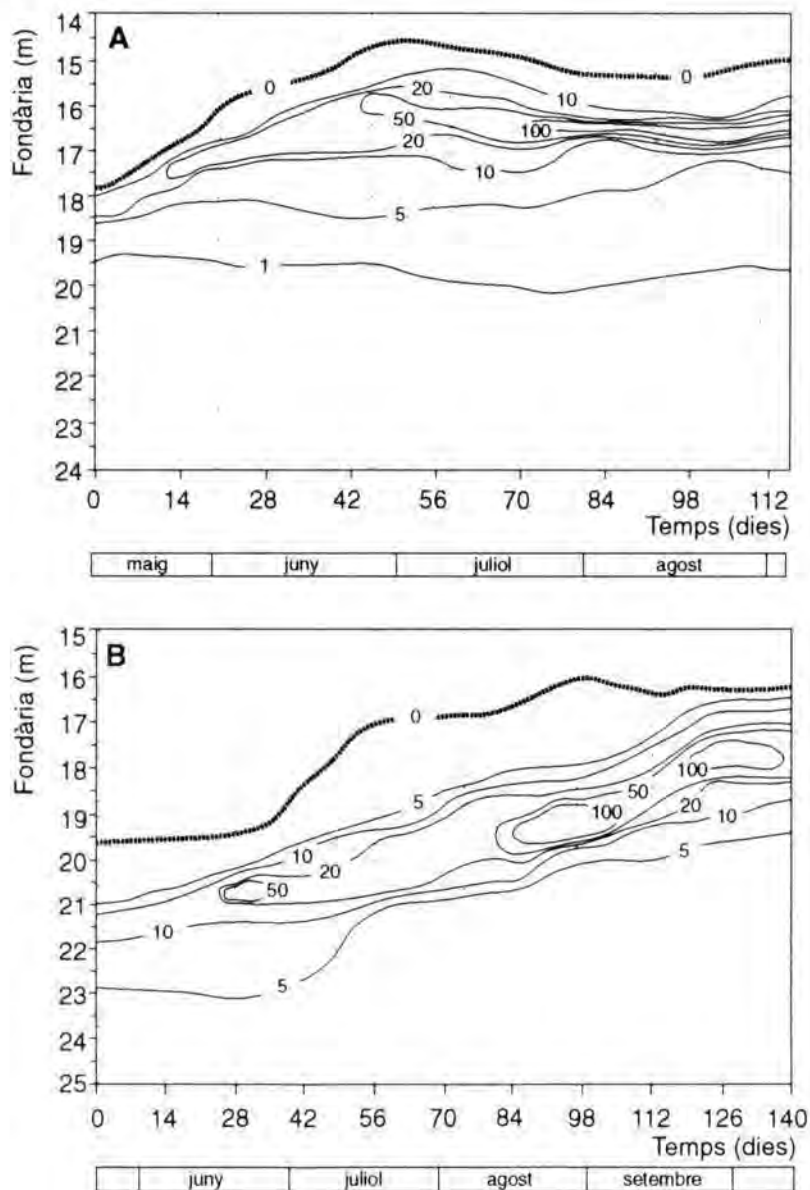


Figura 5.10. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl *a* (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-III mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.10. Time-depth distribution of BChl *a* concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-III measured by HPLC during the stratification period of 1994 (A) and 1995 (B).

L'única diferència entre l'estudi realitzat l'any 1994 i el de 1995 fou la localització del màxim poblacional (Figura 5.10.B). En les fases inicials, la població de *Chromatium minus* es trobava entre 21 i 22 m en concentracions baixes ($10 \mu\text{g l}^{-1}$). Només al final del període d'estratificació i coincidint amb una localització més superficial (19,5-20 m), es van mesurar concentracions de BCl *a* de $100 \mu\text{g l}^{-1}$.

- Okenona

La distribució espàcio-temporal de la concentració d'okenona va anar lligada a la de BCl *a*. En ambdós períodes d'estudi, els valors màxims mai van superar els $50 \mu\text{g l}^{-1}$ d'Okn i sempre van coincidir espacialment i temporal amb els màxims de BCl *a* (Figura 5.11).

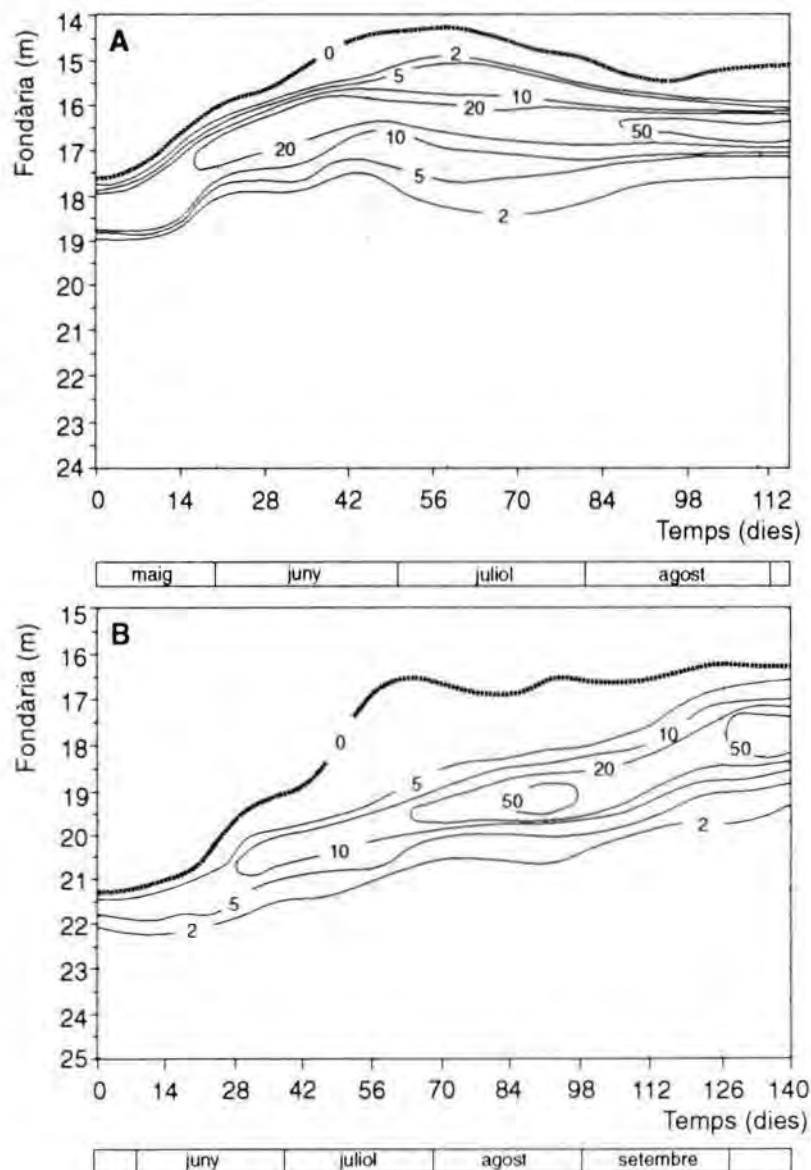


Figura 5.11. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Okn (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-III mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.11. Time-depth distribution of Okn concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-III measured by HPLC during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

• *Bacterioclorofil·la e*

Durant 1994, *Chlorobium phaeobacteroides* va dominar el monimolimnion anaeròbic arribant a concentracions màximes de $200 \mu\text{g l}^{-1}$ de BCl *e* en les primeres fases de l'estudi (Figura 5.12.A). Posteriorment, la concentració de BCl *e* va disminuir progressivament de $200 \mu\text{g l}^{-1}$ a 18 m durant la primavera a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ a 17 m a la tardor, coincidint, a més, amb el desplaçament de la població cap a posicions menys profundes. La dinàmica espàcio-temporal de la població de *Chlorobium phaeobacteroides* durant 1995 fou similar a la de l'any anterior. La màxima concentració de BCl *e* també es va mesurar durant la primavera, disminuint a mida que avançava l'estiu (Figura 5.12.B). També es va observar un desplaçament de la població cap a zones superficials més il·luminades, passant de 22 m al mes de maig a 20 m al setembre. La principal diferència entre els dos períodes estudiats fou la localització de la població bacteriana (a 18 m l'any 1994 i entre 20 i 22 m l'any 1995).

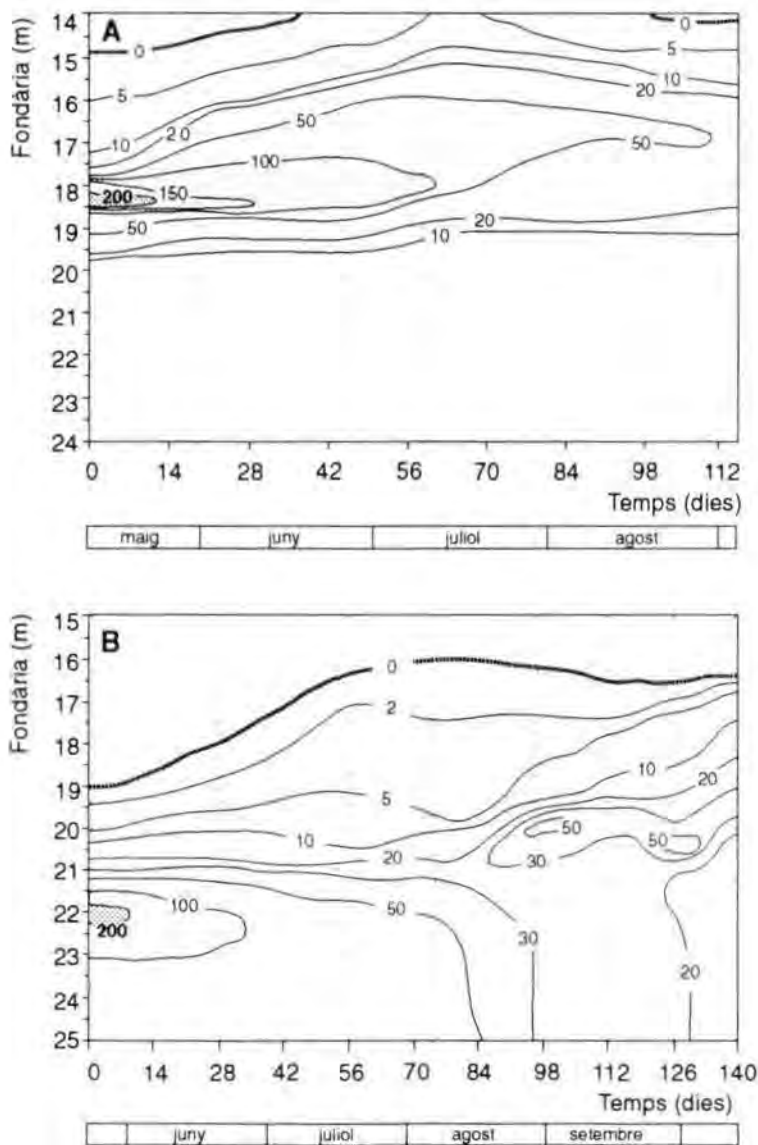


Figura 5.12. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl *e* (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-III mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.12. Time-depth distribution of BChl *e* concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-III measured by HPLC during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

En general, la determinació espectrofotomètrica de la BCl *e* va resultar en una sobreestimació respecte la mesurada amb HPLC. Aquesta sobreestimació, que en alguns casos fou del 50%, va ser deguda a la presència de la Cl *a* que va interferir en l'anàlisi quantitativa (veure apartat 5.3.1).

- Isorenieratè

La distribució espàcio-temporal de la concentració d'isorenieratè fou pràcticament idèntica a la registrada per la BCl *e*. En ambdós períodes, la màxima concentració d'aquest pigment fou de 90 $\mu\text{g l}^{-1}$ d'Isr durant la primavera, per anar disminuint a mida que avançava l'estiu de manera anàloga a la BCl *e* (Figura 5.13). En general, els màxims d'Isr van estar sempre associats als de BCl *e*, tal i com s'observa als perfils verticals de l'índex Car/BCl *e* en ambdós períodes d'estudi (Figura 5.14 i 5.15).

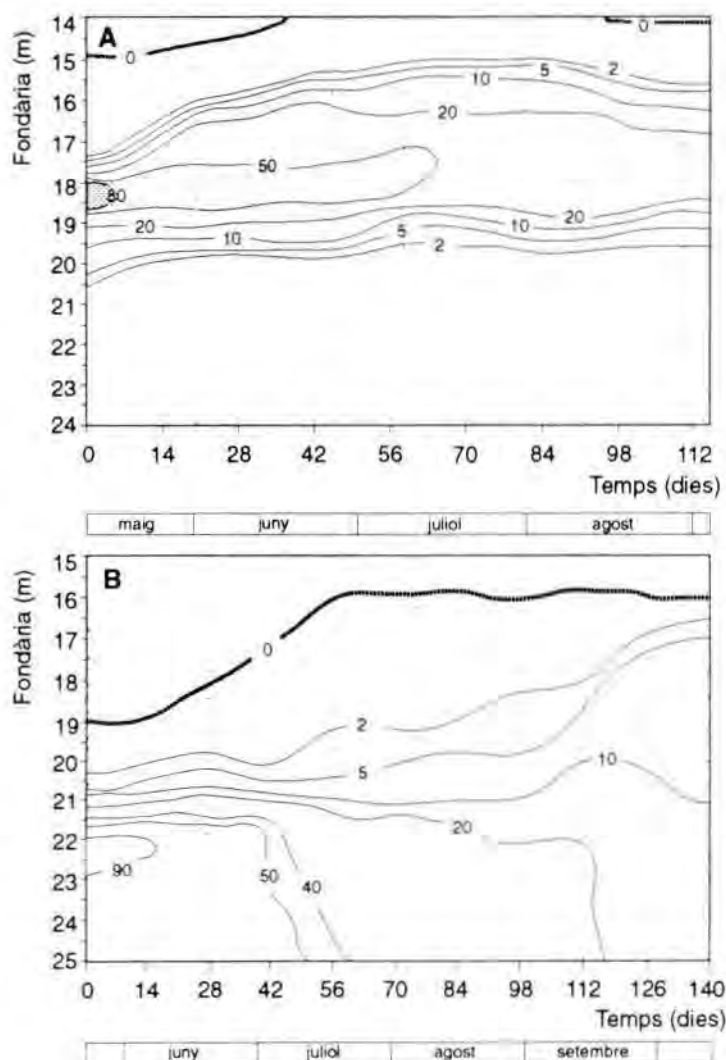


Figura 5.13. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Isr (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-III mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.13. Time-depth distribution of Isr concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-III measured by HPLC during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

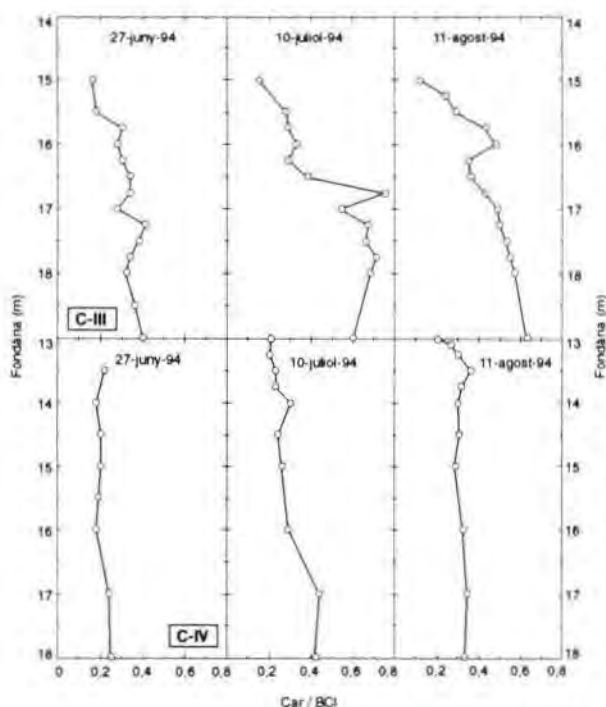


Figura 5.14. Perfils verticals de l'índex Car/BCl a C-III (panell superior) i C-IV (panell inferior) en tres moments del període d'estratificació de 1994.

Figure 5.14. Vertical profiles of Car/BCl index in C-III (upper panel) and C-IV (lower panel) at three different moments of the stratification period of 1994.

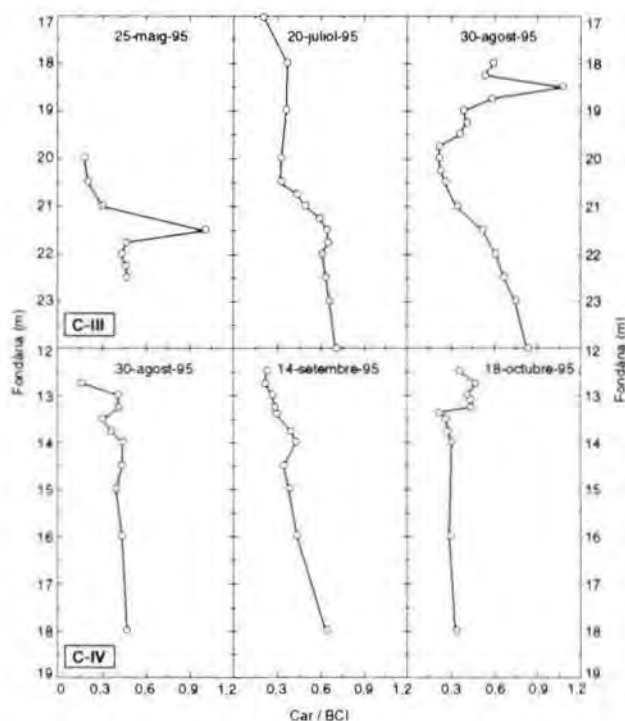


Figura 5.15. Igual que la Fig. 5.14, per 1995.

Figure 5.15. Same as Fig. 5.14 for 1995.

5.2.3.2. Cubeta IV

- *Bacterioclrofil.la a*

La presència de BCl *a* en la cubeta IV es va limitar a la segona meitat dels períodes estudiats, constituint màxims localitzats a la quimioclina i a la zona de gradient òxico-anòxic (Figura 5.16). En ambdós casos, la BCl *a* va començar a ser detectable a partir del mes d'agost. Els màxims es van trobar sempre al final de l'estiu, just en el moment en que la interfase O₂/H₂S es trobava més propera a la superfície (13 m). En aquests període, la intensitat de llum que arribava a la població de *Chromatium minus* fou de 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2% de la llum incident en la superfície). D'altra banda, l'augment en la biomassa de les Cromatiàcies va afectar l'extinció de la llum i per tant la llum disponible pels bacteris verds del sofre (Taula 5.1).

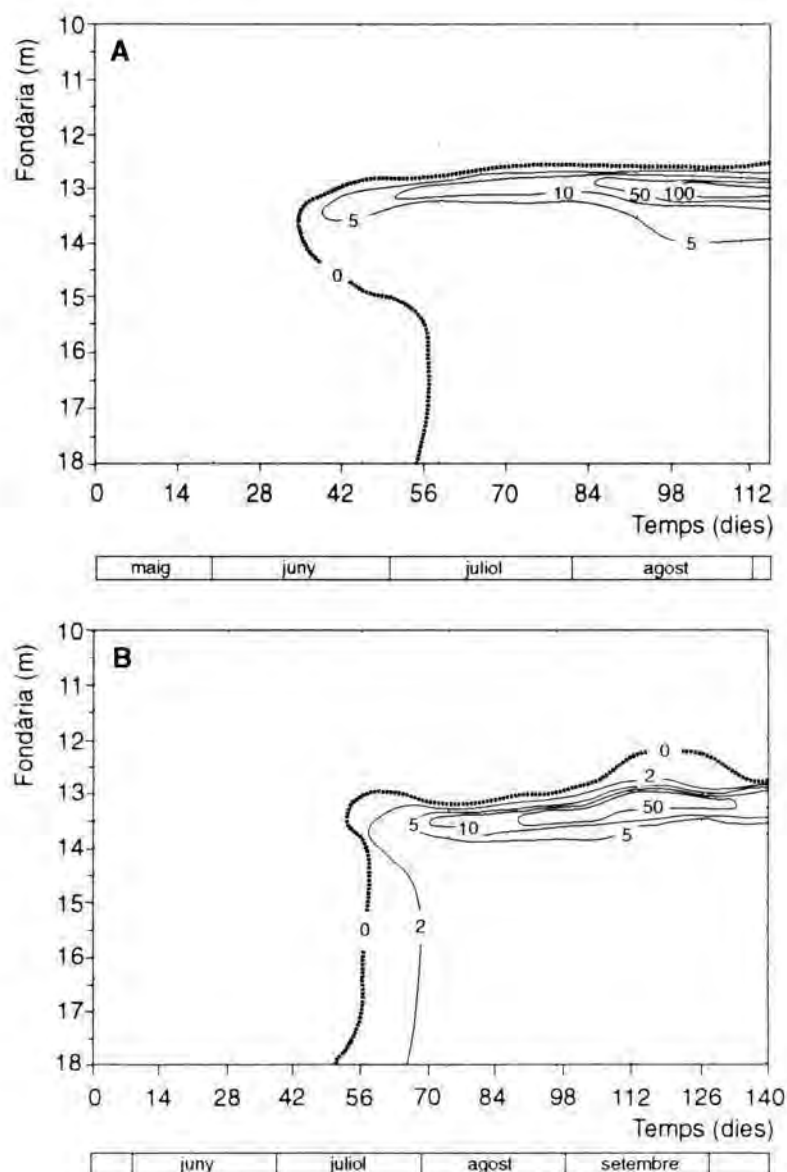


Figura 5.16. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl *a* (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-IV mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.16. Time-depth distribution of BChl *a* concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-IV measured by HPLC during the stratification period of 1994 (A) and 1995 (B).

D'altra banda, la comparació entre les distribucions espàcio-temporals de la concentració de BCl *a* mesurada a l'espectrofotòmetre i al HPLC no ofereix diferències importants (veure apartat 5.3.1).

- Okenona

La distribució espàcio-temporal d'okenona a C-IV segueix les mateixes pautes que en la cubeta III. Aquest carotenoide va anar sempre associat a la de BCl *a*, formant màxims en la zona de la quimioclina (Figura 5.17). En ambdós períodes estudiats, la màxima concentració mesurada fou de $50 \mu\text{g l}^{-1}$ d'Okn.

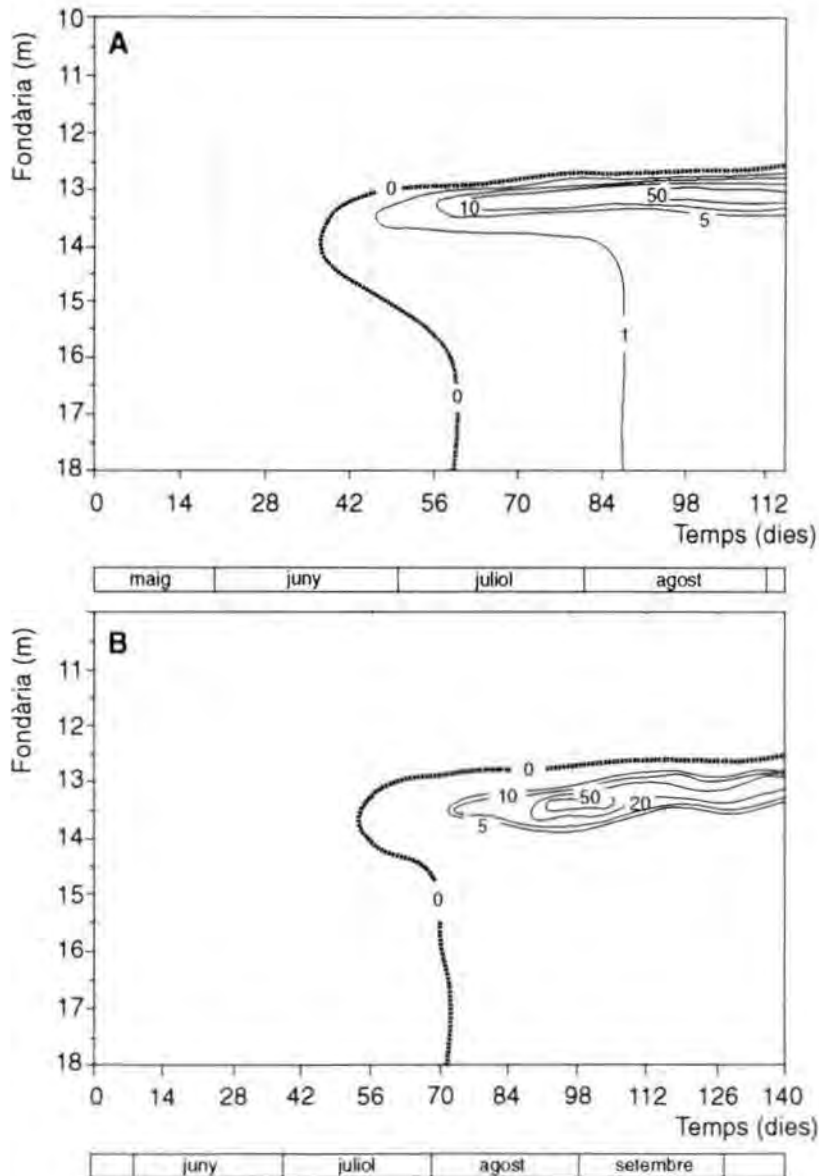


Figura 5.17. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Okn (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-IV mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.17. Time-depth distribution of Okn concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-IV measured by HPLC during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

- *Bacterioclороfil.la e*

Durant 1994, la població de *Chlorobium phaeobacteroides* va dominar el monimolimnion. Les concentracions més altes es van mesurar al final de l'estiu (setembre), arribant fins a un màxim de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ de BCl *e* localitzat a la zona de la quimioclina (13-13,5 m) (Figura 5.18.A). Les concentracions mesurades amb HPLC foren sempre inferiors en tots els casos a les calculades a partir de les dades espectrofotomètriques.

L'any 1995, la làmina bacteriana es va començar a desenvolupar a partir de l'establiment de les condicions d'anòxia al monimolimnion i la posterior acumulació

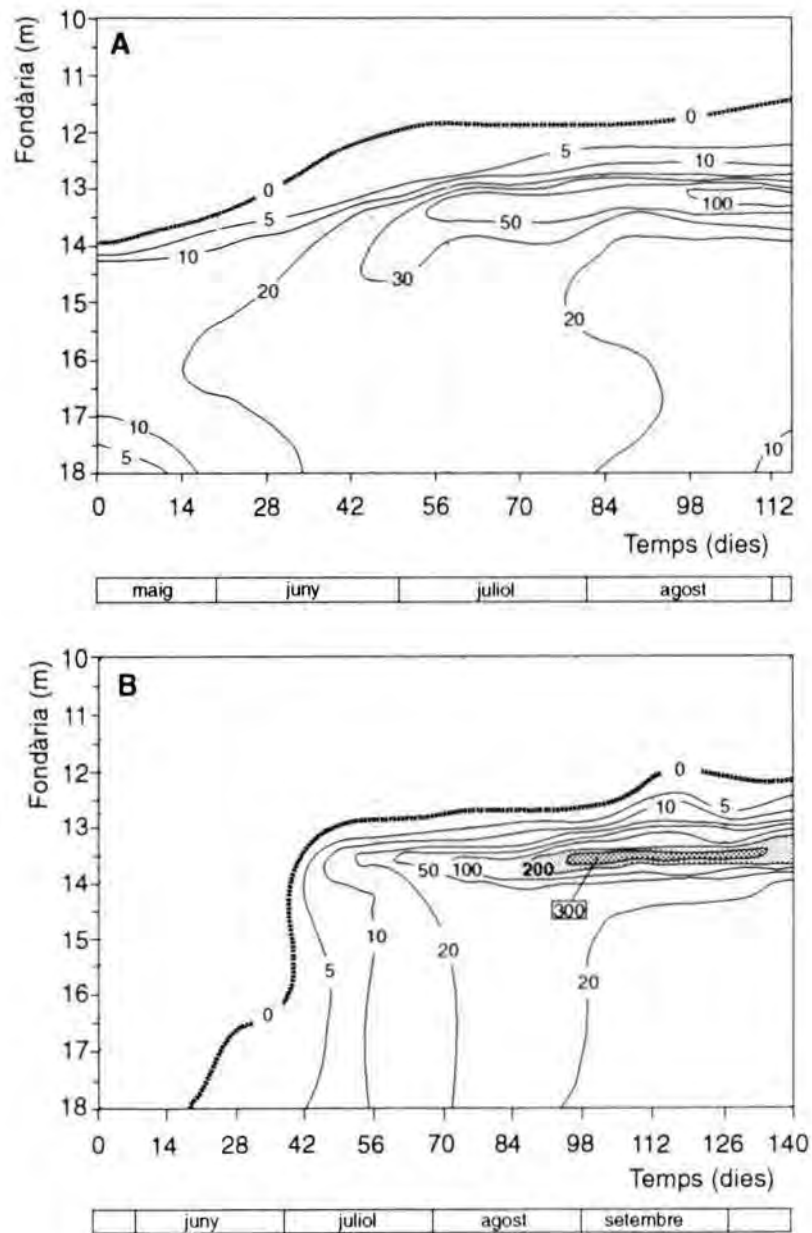


Figura 5.18. Distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl *e* (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-IV mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.18. Time-depth distribution of BChl *e* concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-IV measured by HPLC during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

de sulfhídric (juny-juliol). A partir d'aquest moment la distribució espàcio-temporal de la concentració de BCl e fou similar a la registrada durant l'any anterior (Figura 5.18.B). La població no es va consolidar fins el mes d'agost amb un màxim de BCl e de $300 \mu\text{g l}^{-1}$ localitzat en la mateixa franja de la columna d'aigua que l'any 1994 (13-13,5 m).

• Isorenieratè

La distribució espàcio-temporal d'isorenieratè a la cubeta IV durant els dos períodes estudiats fou molt similar, tant per la localització dels màxims com per les concentracions mesurades ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ a 13,5 m) (Figura 5.19). De forma anàloga als

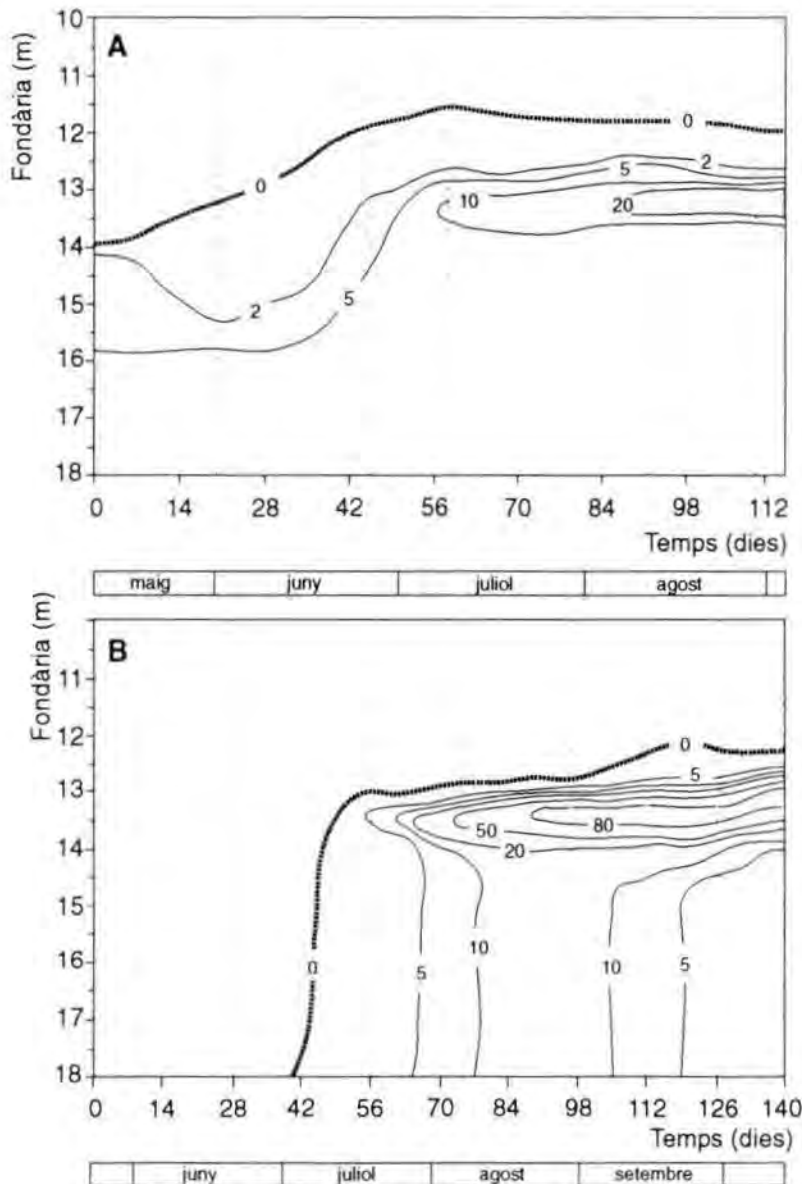


Figura 5.19. Distribució espàcio-temporal de la concentració d'Isr (en $\mu\text{g l}^{-1}$) a C-IV mesurada amb HPLC durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.19. Time-depth distribution of Isr concentration (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in C-IV measured by HPLC during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

resultats obtinguts a la cubeta III, l'índex Car/BChl va mostrar en els dos períodes estudiats un lleuger increment en aquelles fondàries on es localitzava el màxim poblacional així com en zones profundes (Figures 5.14 i 5.15). En general, els valors d'aquest índex van ser sempre inferiors als obtinguts per la població de *Chlorobium phaeobacteroides* de C-III.

5.2.3.3. Estanyol Coromina

La comunitat bacteriana fotosintètica va estar formada per *Pelodictyon clathratiforme*, amb BChl *d*, i pel consorci "Chlorochromatium aggregatum", que es va trobar sempre associat als màxims de BChl *c*. El seguiment acurat d'ambdues poblacions des del punt de vista pigmentari només es va poder realitzar amb HPLC a causa de les similituds espectrals dels dos tipus de bacteriolorofil·les (veure apartat 5.3.1).

- Bacteriolorofil·la *c*

La distribució espàcio-temporal de les concentracions de BChl *c* es mostra a la figura 5.20.A. "Chlorochromatium aggregatum" va coexistir durant tot el període d'estratificació amb una població de *Pelodictyon clathratiforme*, tot i que, en termes d'abundància, la màxima concentració de BChl *c* fou gairebé tres vegades inferior ($400 \mu\text{g l}^{-1}$) a la de BChl *d* associada a *Pelodictyon* ($1300 \mu\text{g l}^{-1}$).

La comunitat fotosintètica bacteriana va aparèixer durant el mes d'abril, moment en què la zona de la columna d'aigua rica en sulfhídric estava prou il·luminada com per permetre el creixement. En les etapes prèvies de l'estudi (gener-abril), les condicions lumíniques en la zona inferior de la columna d'aigua foren limitants pel creixement dels bacteris verds del sofre degut a la presència, prop de la superfície, d'una densa comunitat fitoplanctònica ($> 200 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cl *a*) que causava una forta extinció de la llum per sota 1 m de fondària (Taula 5.1).

Les diferències entre les anàlisis espectrofotomètrica i cromatogràfica van estar relacionades tant amb la distribució pigmentària com amb la seva quantificació. La màxima concentració mesurada amb l'espectrofotòmetre fou de $500 \mu\text{g l}^{-1}$ mentre que la mesurada amb HPLC fou un 20% inferior ($400 \mu\text{g l}^{-1}$). Les interferències en la detecció i quantificació espectrofotomètrica de BChl *d* en la columna d'aigua és deguda tant a la presència de Cl *a* com de BChl *c*.

- Bacteriolorofil·la *d*

La població de *Pelodictyon clathratiforme* fou la dominant en la comunitat bacteriana fotosintètica. *Pelodictyon* va ocupar l'hipolimnion de l'estanyol una vegada desaparegut el filtre lumínic que representava la comunitat fitoplanctònica. La màxima concentració de BChl *d* es va mesurar a 1,5 m per sobre del sediment, arribant a valors de fins a $1300 \mu\text{g l}^{-1}$ (Figura 5.20.B). Aquesta concentració és molt alta si es compara amb les mesures en altres ecosistemes on s'han descrit poblacions de bacteris verds amb BChl *d* (van Gemerden & Mas, 1995).

Les concentracions mesurades amb l'espectrofotòmetre també foren més altes ($2000 \mu\text{g l}^{-1}$) que les obtingudes amb HPLC, confirmant la interferència dels altres pigments clorofil·lics, en aquest cas la Cl *a* i la BChl *c*.

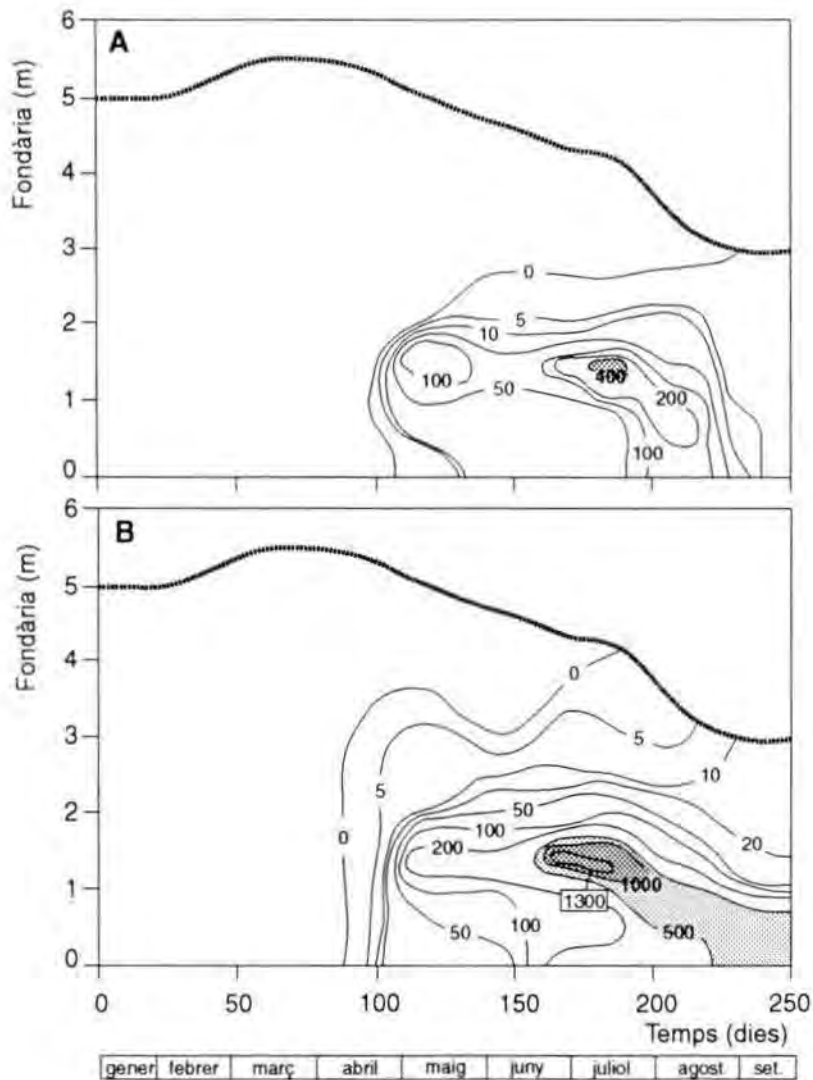


Figura 5.20. Distribució espàcio-temporal de la concentració de (A) BCl *c* i (B) BCl *d* a l'estanyol Coromina durant 1994. Les concentracions es van mesurar amb HPLC i venen donades en $\mu\text{g l}^{-1}$.

Figure 5.20. Time-depth distribution of (A) BChl *c* and (B) BChl *d* concentrations in Coromina lagoon during 1994. Concentrations were measured by HPLC and are given in $\mu\text{g l}^{-1}$.

- Clorobactè

Les dues poblacions bacterianes fotosintètiques presents al Coromina posseeixen el mateix tipus de carotenoide (clorobactè) i per tant va resultar impossible discriminar el contingut d'aquest pigment en les dues espècies. La distribució de Cbt va coincidir espacialment i temporal amb la de BCl *c* i *d*, amb un màxim de 105 $\mu\text{g l}^{-1}$ localitzat a la mateixa zona de la columna d'aigua.

5.2.4. Diversitat dels patrons d'homòlegs de les bacterioclorofil·les en poblacions naturals de bacteris verds

L'aplicació del mètode de cromatografia líquida d'alta resolució desenvolupat ha permès realitzar estudis pigmentaris acurats de les diferents poblacions de bacteris fotosintètics del sofre investigades. Aquests estudis s'han enfocat en dues direccions; per una banda analitzar qualitativament i quantitativa les variacions espàcio-temporals dels pigments antena durant els períodes de creixement estacional (apartat 5.2.5) i per l'altra, determinar la diversitat pel que fa als patrons pigmentaris de les diferents bacterioclorofil·les i els seus homòlegs en poblacions sotmeses a diferents condicions ambientals, en particular les lumíniques. En aquest sentit s'han obtingut diferents patrons corresponents a les bacterioclorofil·les *c*, *d* i *e*. La BCl *a* no es va considerar atès que no presenta formes homòlogues (veure Capítol 3).

5.2.4.1. Poblacions naturals d'espècies marrons: Diversitat de patrons de BCl *e*

Les poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides*, *C. phaeovibrioides*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme* i *P. phaeum* van mostrar patrons d'elució al HPLC similars als obtinguts per la BCl *e* procedent de soques de laboratori, tant pel que fa als temps de retenció dels diferents homòlegs com per el nombre total d'aquests (Figura 5.21). Les diferències foren essencialment quantitatives, això és, en el contingut relatiu dels diferents homòlegs (CRH). Les poblacions naturals d'espècies marrons es caracteritzen per una absència pràcticament total del primer homòlegs de la BCl *e* (BCl e_1) i una dominància variable del segon, tercer i quart homòlegs (BCl e_2 , BCl e_3 i BCl e_4) depenent fonamentalment de les condicions de creixement a què estan sotmeses i a l'estat fisiològic de la població (veure apartat 5.2.5).

5.2.4.2. Poblacions naturals d'espècies verdes: Diversitat de patrons de BCl *c* i *d*

Tot el que s'ha comentat per les espècies marrons és vàlid per les poblacions d'espècies verdes amb BCl *c*. ja que les úniques variacions observades són també d'ordre quantitatiu.

Un cas apart el constitueixen aquelles poblacions de bacteris fotosintètics verds que posseeixen BCl *d*. D'entre aquestes cal destacar tres casos singulars: les poblacions de *Pelodictyon clathratiforme* (estanyol Coromina i llacs EEUU) i de "Chlorochromatium aggregatum" i *Chloronema* spp (llacs EEUU).

El patró d'elució dels homòlegs de la BCl *d* associada a les poblacions naturals de *Pelodictyon clathratiforme* i "Chlorochromatium aggregatum" fou diferent al patró obtingut per aquest mateix pigment en soques de laboratori de *Chlorobium vibriiforme* f. *thiosulfatophilum* (veure Capítol 3, apartat 3.2.1.1). La BCl *d* d'aquest darrer va eluir com a quatre pics majoritaris, entre els minuts 24 i 30, de forma similar a les altres bacterioclorofil·les emparentades estructuralment (BCl *c* i BCl *e*). En canvi, la BCl *d* de *Pelodictyon* i "Chlorochromatium" va eluir en forma de tres homòlegs majoritaris juntament amb un nombre variable d'homòlegs secundaris, pobrement representats, distribuïts de forma irregular al llarg de la cursa de

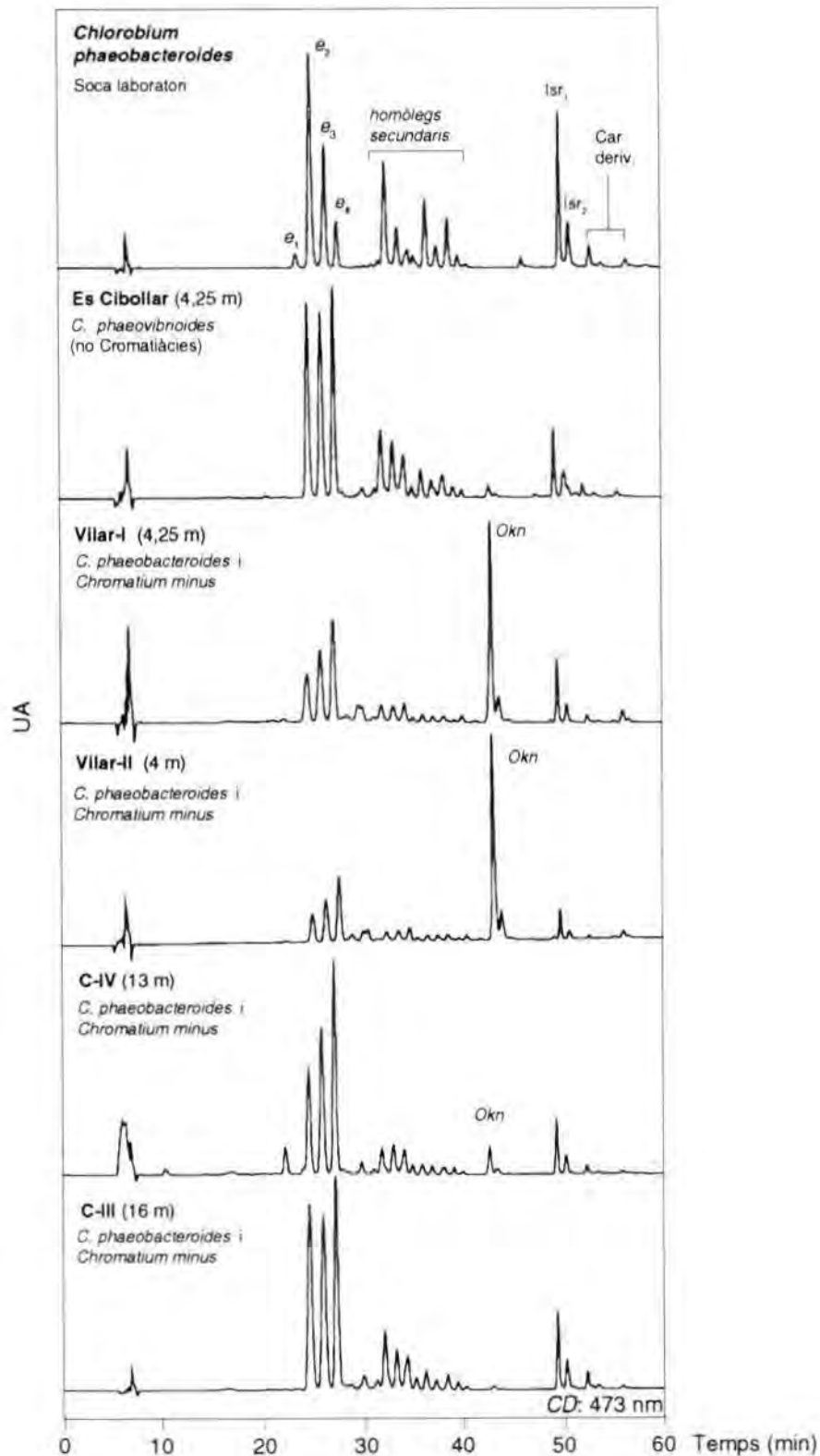


Figura 5.21. Comparació entre el cromatograma d'una soca de laboratori de *Chlorobium phaeobacteroides* i els cromatogrames tipus obtinguts a partir de poblacions naturals d'espècies marrons de bacteris verds del sofre desenvolupades en diferents ecosistemes.

Figure 5.21. Comparison between the chromatogram from a laboratory strain of *Chlorobium phaeobacteroides* and HPLC traces obtained from natural populations of brown species of green sulfur bacteria.

separació (Figura 5.22, Taula 5.4). Malgrat això, ambdues bacterioclороfil·les i els seus homòlegs corresponents tenien el mateix espectre d'absorció –amb màxims a 427 i 656 nm– i una proporció similar entre els seus màxims Soret i Q_y . D'aquí en endavant s'ha emprat el nom de BCl d' per distingir aquesta bacterioclороfil·la de *Pelodictyon* i “Chlorochromatium” de la BCl d de *Chlorobium vibrioforme*.

A més d'aquestes diferències en quant al patró d'elució, es van observar canvis en el contingut relatiu dels tres homòlegs majoritaris de la BCl d' en les poblacions de bacteris verds del sofre estudiades. Mentre que en la població de *Pelodictyon clathratiforme* del Coromina el primer homòleg de la BCl d' va ser majoritari (52,1% de BCl d'_1 ; 32,4% de BCl d'_2 i 15,5% de BCl d'_3) en aquelles poblacions d'aquesta mateixa espècie desenvolupades en els llacs nord-americans l'homòleg predominant fou el BCl d'_2 (24,8% de BCl d'_1 ; 55,4 de BCl d'_2 i 19,8% de BCl d'_3) (Figura 5.21).

Un altra cas particular el va constituir l'obtenció d'un patró d'elució per la BCl d completament diferent als descrits anteriorment. En aquest cas, les mostres analitzades corresponien a aquells llacs de Nord-Amèrica on *Chloronema* spp. era l'espècie dominant al metalimnion (llacs Fish, Jones, Little Long, Mary, Minocqua i Mud) (Abella, comunicació personal). Els extractes pigmentaris d'aquestes mostres van mostrar una distribució singular dels homòlegs de la BCl d en la carrera cromatogràfica (Figura 5.23.A), amb la presència de 7 homòlegs que van eluir entre els minuts 35 i 45 (Taula 5.4). També en aquest cas, els espectres d'absorció dels diferents homòlegs de la BCl d de *Chloronema* foren idèntics al mesurats per la BCl d de *Chlorobium vibrioforme* i la BCl d' de *Pelodictyon clathratiforme* i “Chlorochromatium aggregatum”. Tot i això, el comportament cromatogràfic de la BCl d de *Chloronema* suggereix diferències estructurals respecte la BCl d i la BCl d' i, per tant, hom s'hi referirà com a BCl d'' per diferenciar-la d'aquestes últimes.

Sota el metalimnion dominat per *Chloronema*, la comunitat fotosintètica passava a estar composta per espècies marrons o bé per altres espècies verdes. En aquests darrers casos, l'espècie predominant fou *Pelodictyon clathratiforme* (amb BCl d'). Les anàlisis cromatogràfiques d'aquestes mostres hipolimnètiques van produir el mateix patró d'elució de la BCl d' que l'obtingut en altres llacs dominats gairebé de forma exclusiva per aquesta espècie (Figures 5.22.B i 5.23.B).

5.2.5. Ecologia pigmentària dels bacteris fotosintètics del sofre: variacions espàcio-temporals del contingut en homòlegs

L'anàlisi cromatogràfica de les mostres de camp va permetre el seguiment en el temps i l'espai del contingut dels diferents homòlegs de les bacterioclороfil·les presents en les poblacions naturals. L'estudi es va realitzar mesurant els continguts relatius dels quatre homòlegs principals de la BCl e a les cubetes III i IV de l'estany i dels tres homòlegs de la BCl d' a l'estanyol Coromina. Això es va portar a terme mesurant el percentatge de l'alçada dels pics corresponents a cadascun d'aquest pigments en els respectius cromatogrames. La monitorització del contingut dels diferents homòlegs va permetre observar aspectes rellevants d'aquells homòlegs que

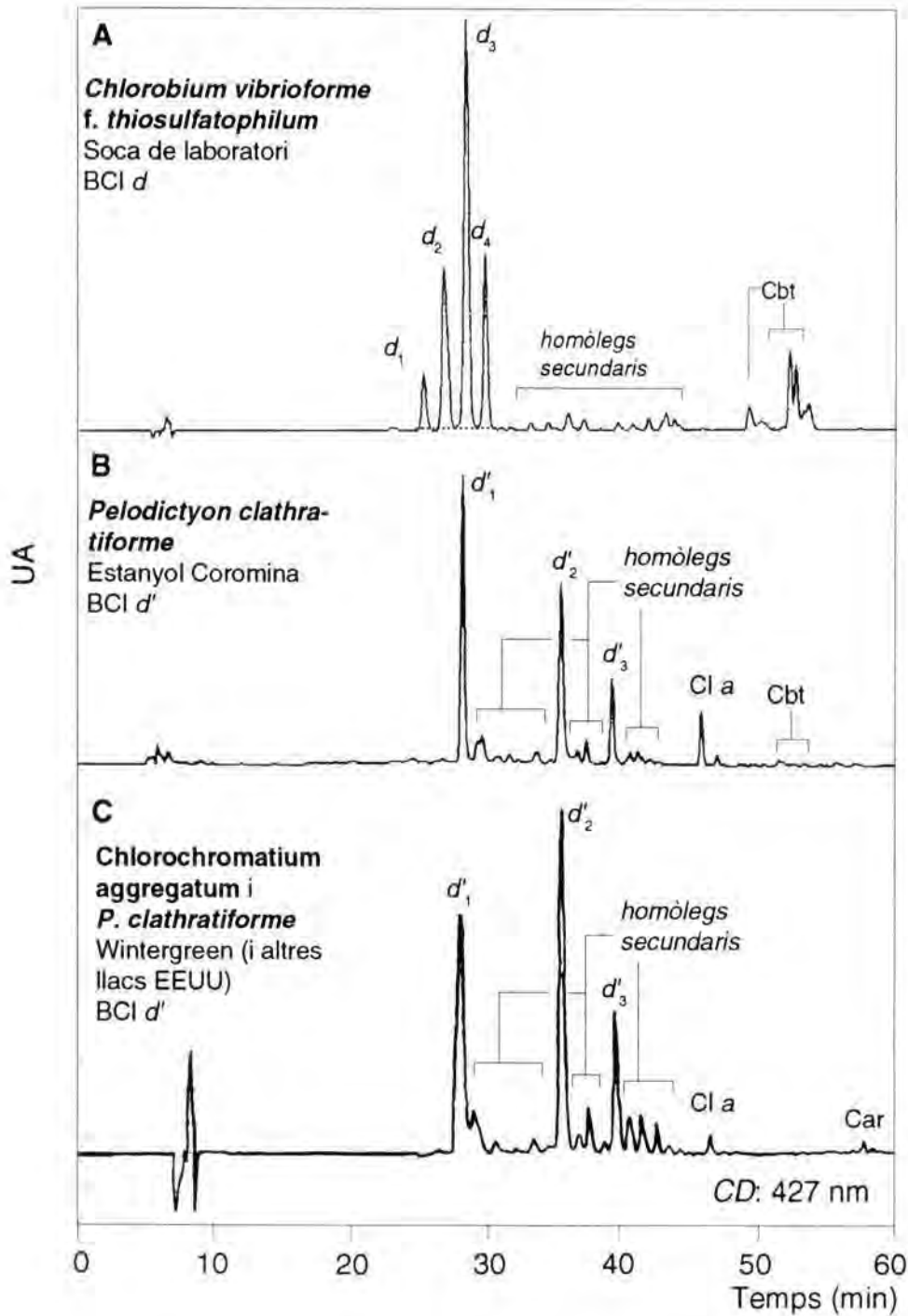


Figura 5.22. Comparació dels patrons cromatogràfics de (A) BCI d d'una soca de laboratori de *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum*, (B) BCI d' d'una població de *Pelodictyon clathratiforme* a l'estanyol Coromina i (C) BCI d' de la comunitat fotosintètica, formada per "*Chlorochromatium aggregatum*" i *P. clathratiforme*, en el llac Wintergreen.

Figure 5.22. Comparison between the HPLC traces of (A) BCI d from a laboratory strain of *Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum*, (B) BCI d' corresponding to a *Pelodictyon clathratiforme* population developed in Coromina lagoon, and (C) BCI d' of the photosynthetic community, dominated by "*Chlorochromatium aggregatum*" and *P. clathratiforme*, of Wintergreen lake.

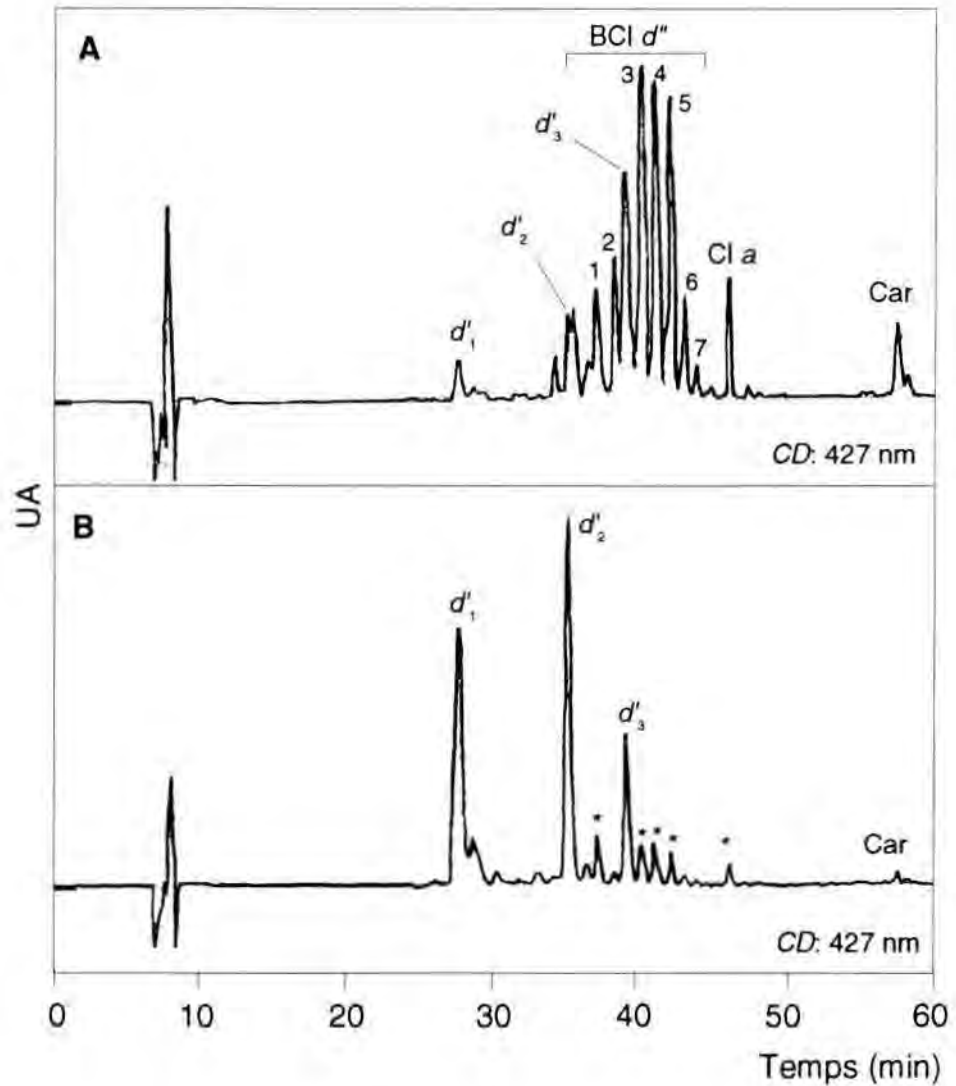


Figura 5.23. Patrons cromatogràfics dels extractes pigmentaris de mostres naturals del llac Jones. (A) Mostra de 4 m on s'observen els 7 pics corresponents als homòlegs de la BCl d'' , associats a una població de *Chloronema* spp. També són evidents els 3 homòlegs de la BCl d' , atribuïts a la població de *Pelodictyon clathratiforme* present a fondàries més profundes (B) Mostra de 5 m on ja s'observen els tres homòlegs principals de la BCl d' com a dominants a aquesta fondària.

Figure 5.23. HPLC traces of pigments extracts obtained from natural samples of Jones lake. (A) Sample from 4 m where seven peaks attributable to BCl d'' homologs from *Chloronema* spp. are visible together with the three peaks of BCl d' corresponding to a *Pelodictyon clathratiforme* population developed below. (B) Sample from 5 m; the three main BCl d' homologs from *Pelodictyon* are the most abundant pigment at this depth.

van mostrar l'índex de variació més important (BCl e_4 i BCl d'_1 - d'_3). Les variacions registrades pel total d'homòlegs s'han representat integrant els continguts absoluts de cadascun d'aquests per les diferents dates de mostreig, la qual cosa facilita la visió de canvi temporal de les mateixes.

Taula 5.4. Temps de retenció i màxims d'absorció dels principals homòlegs dels tres tipus de BCl d trobats. F: farnesol, (?): no identificat.

Table 5.4. Retention times and absorption maxima of the main homologues of the three types of BCl d found. F: farnesol, (?): not identified.

Pigment	Temps de Retenció (min)	λ max. (nm)	Espècie
BCl _F d ₁	25,06 ± 0,10	408–427–656	<i>Chlorobium vibrioforme</i> f. <i>thiosulf.</i>
BCl _F d ₂	26,48 ± 0,10	408–427–656	"
BCl _F d' ₁	27,32 ± 0,08	408–427–656	<i>Pelodictyon clathratiforme</i>
BCl _F d' ₃	28,04 ± 0,11	408–427–656	<i>Chlorobium vibrioforme</i> f. <i>thiosulf.</i>
BCl _F d' ₄	29,46 ± 0,10	408–427–656	"
BCl _F d'' ₂	34,84 ± 0,08	408–427–656	<i>Pelodictyon clathratiforme</i>
BCl _F d'' ₁	37,51 ± 0,07	408–427–656	<i>Chloronema</i> spp.
BCl _F d'' ₂	38,24 ± 0,10	408–427–656	"
BCl _F d'' ₃	38,69 ± 0,13	408–427–656	<i>Pelodictyon clathratiforme</i>
BCl _F d'' ₃	39,31 ± 0,13	408–427–656	"
BCl _F d'' ₄	40,31 ± 0,09	408–427–656	<i>Chloronema</i> spp.
BCl _F d'' ₅	41,37 ± 0,10	408–427–656	"
BCl _F d'' ₆	42,31 ± 0,06	408–427–656	"
BCl _F d'' ₇	43,11 ± 0,04	408–427–656	"

5.2.5.1. Cubeta III

La població de *Chlorobium phaeobacteroides* de C-III va experimentar variacions importants tant en la composició d'homòlegs de la BCl e com en la seva distribució. El primer homòleg (BCl e₁) va ser pràcticament indetectable durant la major part del dos períodes estudiats, amb continguts relatius que mai van superar el 1% del total de BCl e_F. Les variacions més importants es van registrar en el contingut de BCl e₄.

L'any 1994, els continguts relatius de BCl e₄ foren més elevats que l'any 1995, arribant a valors del 46% del total de BCl e_F (Figura 5.24.A). El contingut en BCl e₄ va augmentar amb la fondària i també a mida que la població envellia (del 36% a 15 m al mes de maig al 46% a 17 m a l'agost) arribant als valors màxims al final del període d'estratificació. Aquest continguts elevats de BCl e₄ es van atribuir a una resposta adaptativa de la població davant la disminució de la intensitat de llum disponible, causada per la presència en la làmina d'aigua immediatament superior d'una densa població de *Chromatium minus* (Figura 5.10). En general, els continguts relatius màxims van estar sempre associats a la làmina bacteriana, disminuint per sobre o per sota d'aquesta.

Durant l'any 1995 els continguts relatius màxims de BCl e_4 foren del 43% del total de BCl e_F (Figura 5.24.B), trobant-se també estretament associats al màxim poblacional de *Chlorobium phaeobacteroides* (localitzat al voltant de 22 m). En zones superiors, ocupades per les Cromatiàcies, els valors de BCl e_F mai van superar el 40%.

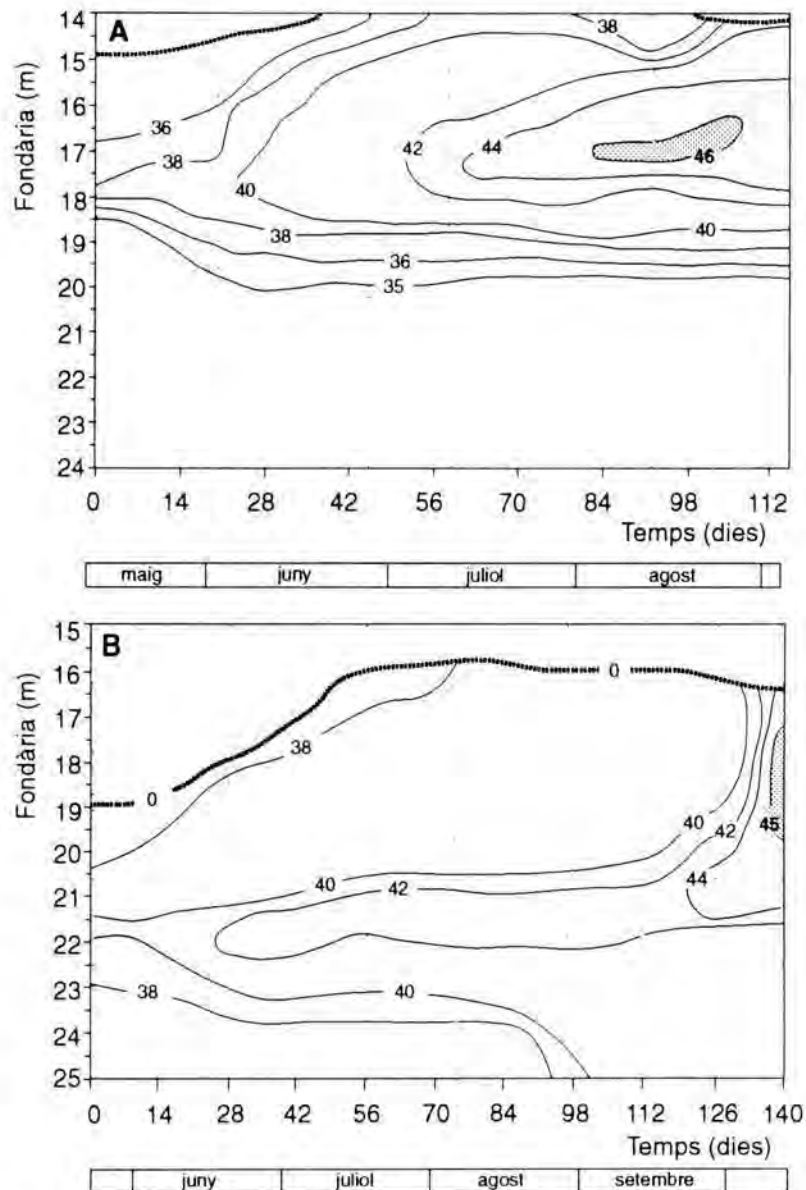


Figura 5.24. Distribució espàcio-temporal del contingut relatiu de BCl e_4 (en %) a C-III durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.24. Time-depth distribution of the relative content of BChl e_4 (in %) in C-III during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

En la figura 5.25 es representa la variació temporal de les concentracions integrades dels quatre homòlegs de la BCl e l'any 1994 (A) i 1995(B). En ambdós casos la concentració absoluta del quart homòleg va augmentar a mida que avançava l'estratificació. El contingut dels diferents homòlegs durant 1994 va mostrar una

transició des d'un patró amb dominància dels homòlegs BCl e_2 i BCl e_3 en les primeres fases de l'estudi a un altre dominat per BCl e_4 . Aquesta transició no fou tant evident l'any 1995, ja que des del mes de maig la composició d'homòlegs fou similar, amb una dominància dels homòlegs tercer i quart de la BCl e .

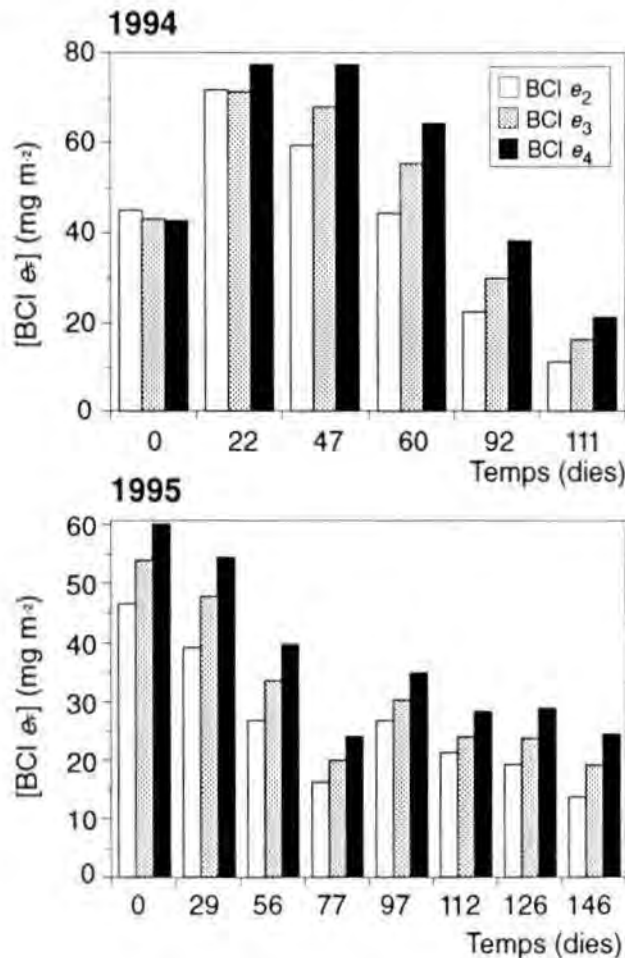


Figura 5.25. Evolució de les concentracions integrades dels principals homòlegs de la BCl e a C-III durant els dos períodes estudiats.

Figure 5.25. Evolution of the integrated concentrations of the main BChl e homologs in C-III during the study periods.

Els homòlegs secundaris van mostrar variacions tant amb la fondària com durant el creixement de la població. En general, el contingut d'homòlegs secundaris incrementava amb la fondària, arribant a representar fins el 40% del total de BCl e (Figures 5.26 i 5.27). L'any 1995 es va observar la presència de dos màxims en el contingut d'aquest pigments, un localitzat a la zona de la làmina bacteriana i l'altra en les capes profundes de la columna d'aigua. El primer d'aquest màxims podria estar relacionat amb l'estat fisiològic de la població de *Chlorobium phaeobacteroides* mentre que el segon tindria probablement un origen degradatiu ja que estaria associat a les cèl·lules en procés de sedimentació.

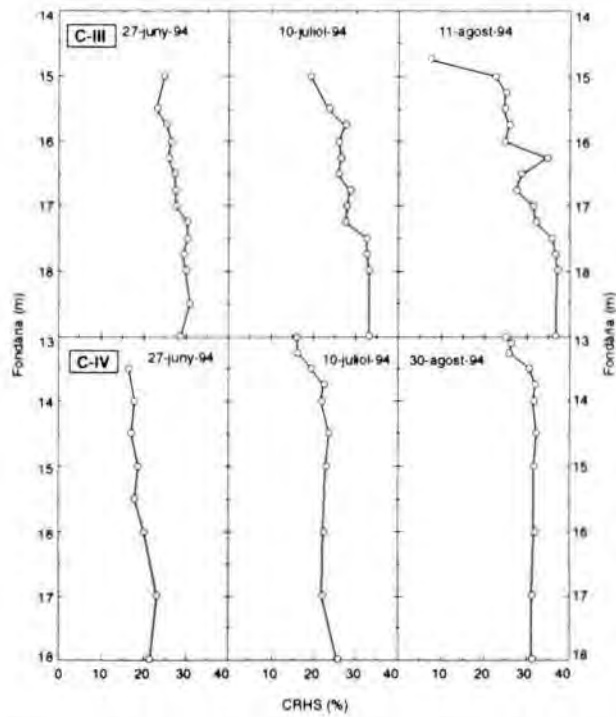


Figura 5.26. Perfils verticals del contingut relatiu d'homòlegs secundaris de la BChl *e* (CRHS, en %) a C-III (panell superior) i C-IV (panell inferior) en tres moments del període d'estratificació de 1994.

Figure 5.26. Vertical profiles of the relative content of secondary BChl *e* homologs (CRHS, in %) in C-III (upper panel) and C-IV (lower panel) at three different moments of the stratification period of 1994.

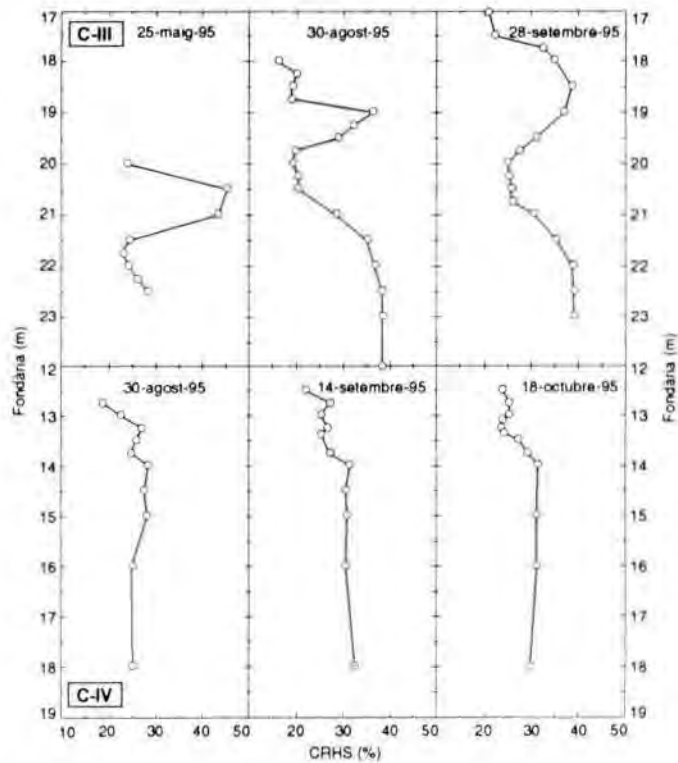


Figura 5.27. Igual que la Fig. 5.26, per 1995.

Figure 5.27. Same as Fig. 5.26 for 1995.

5.2.5.2. *Cubeta IV*

A la cubeta IV, les diferències en el contingut relatiu d'homòlegs foren del mateix ordre a les registrades a C-III. L'any 1994, el contingut relatiu de BCl e_4 va augmentar amb la fondària (del 35% a 12 m al 42% a 14 m) (Figura 5.28.A). Els valors màxims (43,5%) es van mesurar al final del període d'estratificació. Durant 1995, la dinàmica de variació del quart homòleg de la BCl e fou similar a l'any anterior (Figura 5.28.B). A diferència de 1994, on la població de *Chlorobium* va mantenir des de l'inici un patró d'homòlegs constant, el contingut en BCl e_4 l'any 1995 va anar augmentant

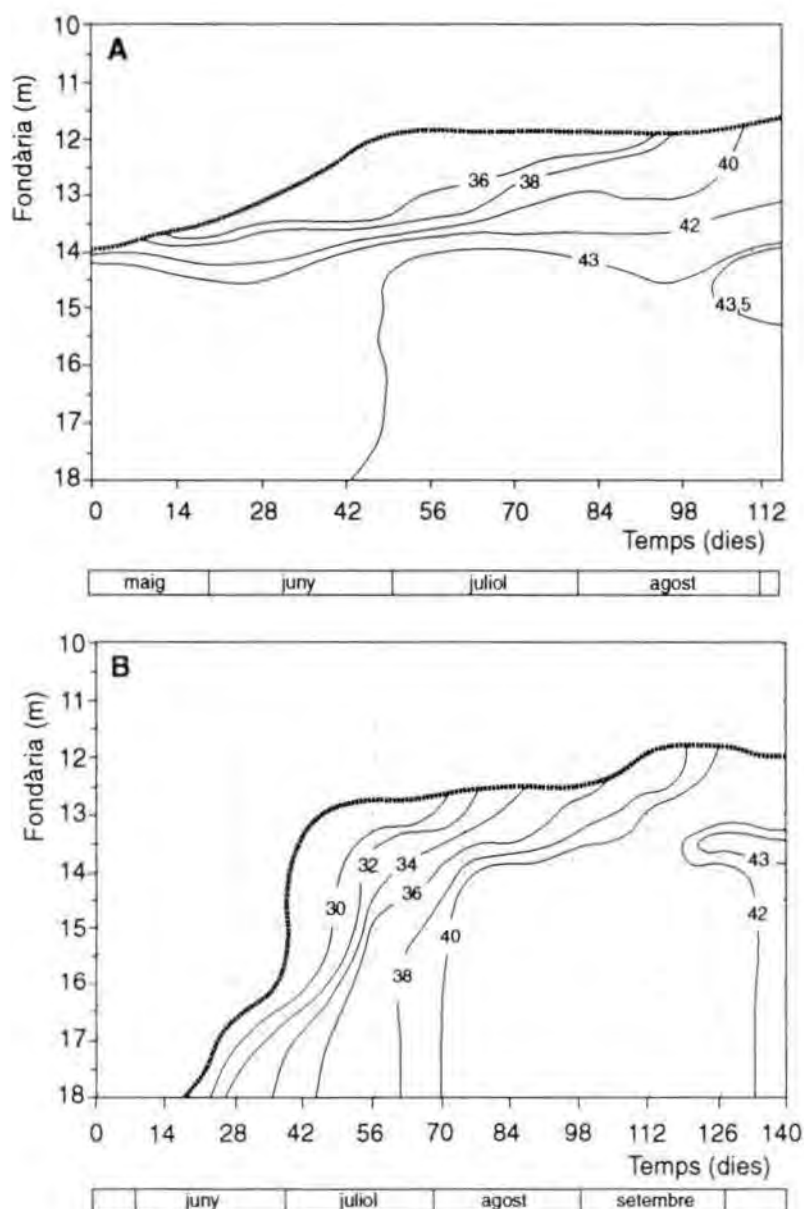


Figura 5.28. Distribució espàcio-temporal del contingut relatiu de BCl e_4 (en %) a C-IV durant els períodes d'estratificació de 1994 (A) i 1995 (B).

Figure 5.28. Time-depth distribution of the relative content of BChl e_4 (in %) in C-IV during the stratification periods of 1994 (A) and 1995 (B).

progressivament durant l'estiu. A les fases inicials del creixement (juliol) el contingut relatiu de BCl e_4 fou baix (< 35%) en comparació amb C-III o amb etapes posteriors de la pròpia cubeta IV, on es van mesurar continguts del 40 al 41% (agost). La cubeta IV constitueix un exemple de l'augment progressiu del contingut en BCl e_4 a mida que la intensitat de llum disponible per la població es veu reduïda (Figura 5.3), generalment a causa de l'ombrejat propi o pel produït per les Cromatiàcies presents més amunt.

Si bé l'any 1994 la població de *Chlorobium phaeobacteroides* va mantenir un patró d'homòlegs gairebé constant durant tot el període de creixement (Figura 5.29.A), durant 1995 les variacions en les concentracions integrades dels quatre homòlegs principals van reflectir aquesta adaptació gradual a la que s'ha fet referència (Figura 5.29.B). L'any 1995, la transició fins el patró final dominat per BCl e_4 es va dur a terme en tres estadis intermitjos, amb concentracions decreixents de BCl e_2 i creixents del tercer i quart homòlegs. Una vegada assolit el patró final, aquest es va mantenir estable durant la resta del període estudiat.

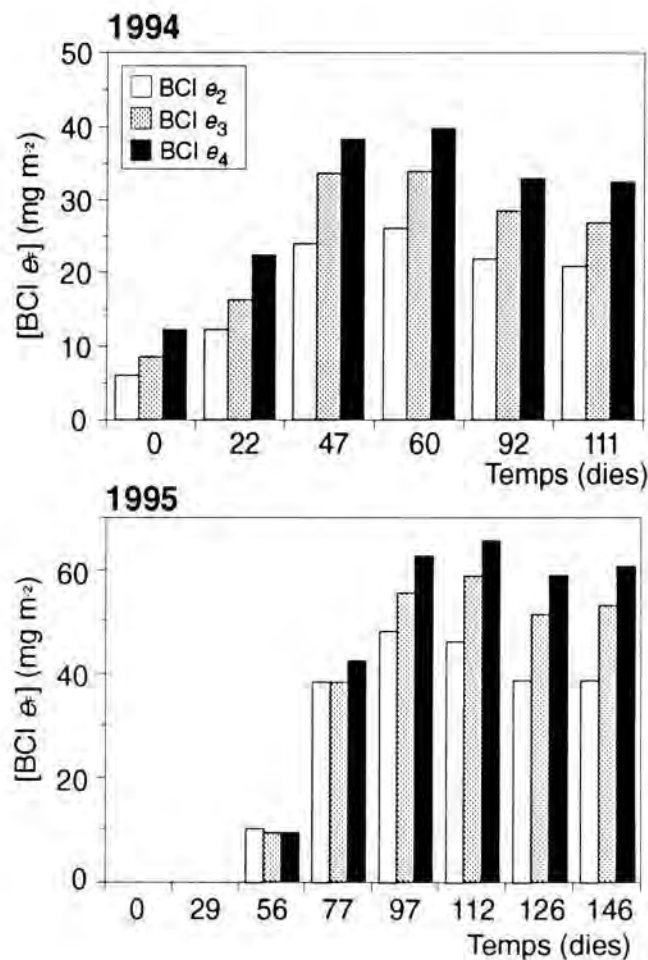


Figura 5.29. Evolució de les concentracions integrades dels principals homòlegs de la BCl e a C-IV durant els dos períodes estudiats.

Figure 5.29. Evolution of the integrated concentrations of the main BChl e homologs in C-IV during the study periods.

Les variacions en fondària dels homòlegs secundaris en la població de *Chlorobium phaeobacteroides* de la cubeta IV no van ser tant destacades com les trobades a C-III, tot i que també es va detectar un augment del CRHS en les capes profundes de la columna d'aigua (Figures 5.26 i 5.27). En ambdós períodes estudiats, el CRHS va augmentar a mida que la població envellia (del 20% al 30% al 1994 i del 25% al 30% al 1995).

5.2.5.3. Estanyol Coromina

La figura 5.30 mostra la distribució espàcio-temporal del contingut relatiu dels homòlegs majoritaris de la BCl d' (BCl d'_1 i BCl d'_3) en l'estanyol Coromina durant el creixement de *Pelodictyon clathratiforme*. Les variacions espàcio-temporals d'ambdós pigments semblen seguir dues direccions: i) una disminució del primer homòleg amb la fondària i, ii) un increment progressiu del tercer homòleg tant amb la fondària com en el temps.

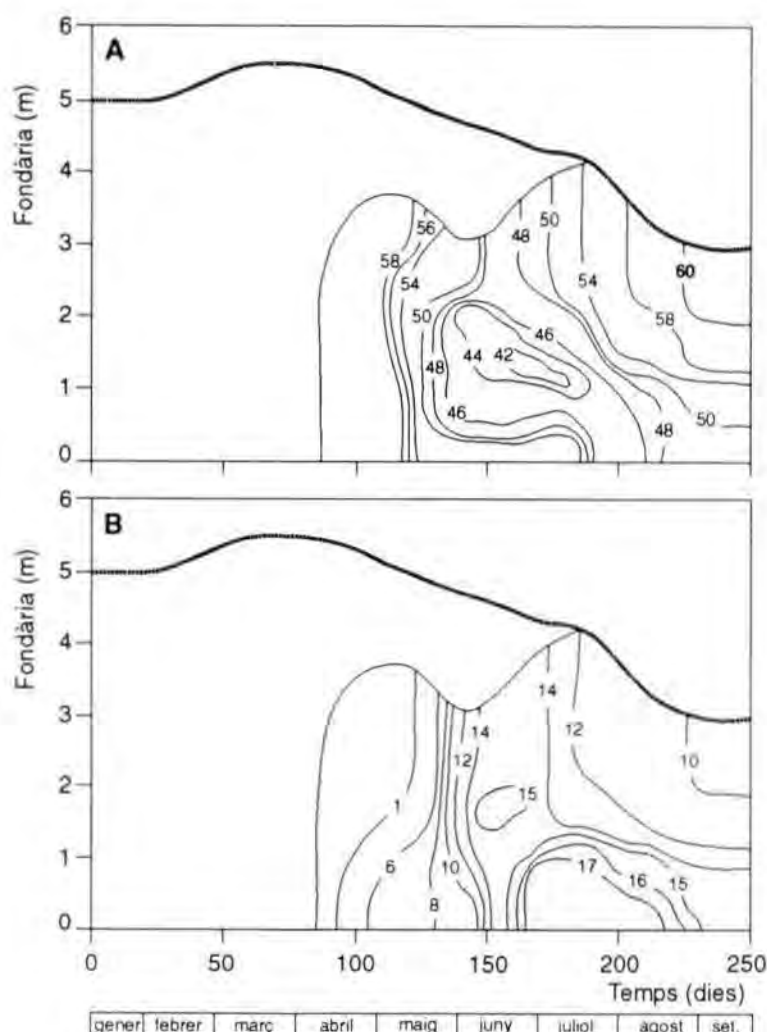


Figura 5.30. Distribució espàcio-temporal del contingut relatiu de (A) BCl d'_1 i (B) BCl d'_3 (en %) a l'estanyol Coromina durant el període d'estratificació de 1994.

Figure 5.30. Time-depth distribution of relative content of (A) BChl d'_1 and (B) BChl d'_3 (in %) in the Coromina lagoon during the stratification period 1994.

En la zona ocupada pel màxim poblacional de *Pelodictyon* els continguts relatius de BCl d'_1 foren els més baixos (42%) mentre que els valors màxims (60%) es van mesurar al final de l'etapa d'estratificació, quan la població es trobava més propera a la superfície (Figura 5.30.A). La disminució en l'abundància relativa de BCl d'_1 en la zona de la làmina bacteriana es va donar juntament amb l'augment del contingut en BCl d'_3 , que va passar de ser indetectable en les primeres fases de l'estudi a valors del 15 al 17% en les fases finals (Figura 5.30.B).

Les concentracions integrades dels tres homòlegs de la BCl d' no van mostrar variacions tant destacables com les observades amb la BCl e en les cubetes de l'Estany (Figura 5.31). Des de l'inici del desenvolupament de la població de *Pelodictyon clathratiforme*, els continguts en BCl d'_1 , BCl d'_2 i BCl d'_3 van augmentar per uns factors de 5, 8 i 11, respectivament. Això sembla evidenciar un enriquiment de la població en aquells homòlegs més alquilats (BCl d'_3) durant el creixement.

En el cas de la BCl c de "*Chlorochromatium aggregatum*", no va ser possible mesurar el contingut dels corresponents homòlegs degut al solapament entre el primer i quart homòleg de la BCl c amb alguns homòlegs minoritaris de la BCl d' .

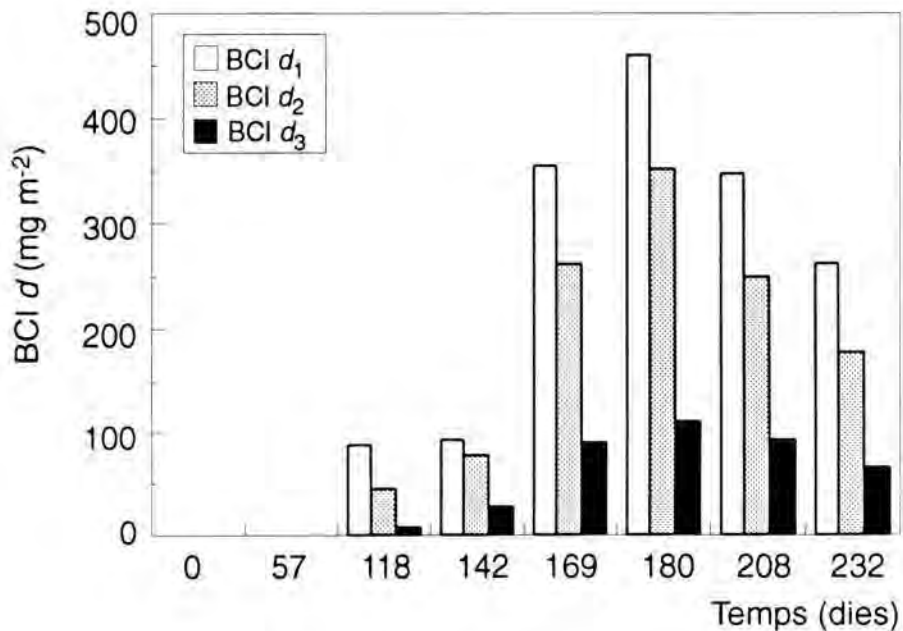


Figura 5.31. Pàgina següent. Evolució de les concentracions integrades dels principals homòlegs de la BCl d a l'estanyol Coromina durant el període d'estratificació de 1994.

Figure 5.31. Next page. Evolution of the integrated concentrations of the main BChl d homologs in Coromina lagoon during the stratification period of 1994.

5.3. DISCUSSIÓ

5.3.1. Comparació entre la determinació espectrofotomètrica i cromatogràfica de Clorofil·la *a* i bacterioclorigil·les en mostres naturals

La identificació i quantificació espectrofotomètrica de les diferents bacterioclorigil·les en un extracte mixt és difícil degut al solapament entre els espectres d'absorció dels diferents pigments. Les interferències són més acusades si en l'extracte en qüestió també hi trobem pigments eucariotes, com ara la Cl *a*, fet que és habitual en mostres naturals, on les poblacions microbianes fotosintètiques sovint comparteixen el temps i l'espai. De fet, són freqüents en la bibliografia treballs i revisions sobre l'origen d'aquestes interferències i la seva possible correcció (Madigan i Brock, 1976; Whitney i Darley, 1979; Tolstoy i Tóth, 1980; Caraco i Puccoon, 1986; Knowlton *et al.*, 1989; Caraco, 1989). D'ençà que va començar l'aplicació de les tècniques cromatogràfiques, especialment HPLC, en l'anàlisi de pigments fotosintètics en mostres naturals, han estat nombrosos els treballs de comparació entre aquestes i les tècniques espectrofotomètriques i fluoromètriques tradicionals (Nush, 1980; Jacobsen, 1982; Murray *et al.*, 1986; Jacobsen i Rai, 1990; Meyns *et al.*, 1994).

En el present estudi, la utilització de la HPLC en l'anàlisi pigmentari ha permès solucionar els problemes derivats de l'ús de la tècnica espectrofotomètrica, tot i que, aquesta última, s'ha utilitzat amb finalitats comparatives. Les concentracions dels diferents pigments mesurades amb l'espectrofotòmetre han estat sempre més elevades que les calculades amb HPLC, coincidint amb el descrit per altres autors (Jacobsen, 1982; Mantoura i Lewellyn, 1983; Gieskes i Kraay, 1983; Jacobsen i Rai, 1990, Meyns *et al.*, 1994). La sobreestimació és atribuïble tant al solapament entre els diferents espectres d'absorció com a la presència de productes de degradació i/o alomeritzacions de les molècules de pigment, especialment la Cl *a* (Hynninen i Assandri, 1973), factors que contribueixen a augmentar les corresponents absorbàncies de lectura utilitzades pel càlcul espectrofotomètric. L'anàlisi cromatogràfica evita aquestes interferències ja que separa els diferents pigments de la mostra en base a les seves estructures moleculars.

Les diferències en les concentracions de les bacterioclorigil·les obtingudes amb un i altre mètode depenen tant del tipus de pigment com de la seva abundància. En mostres naturals amb Cl *a*, la interferència en la determinació espectrofotomètrica de les diferents BCl depèn del grau de similitud entre els espectres d'absorció d'aquestes últimes amb el de la Cl *a*. Això es posa de manifest en la figura 5.32, on es mostra la relació entre la concentració real de pigment (calculada amb HPLC) en mostres naturals i l'obtinguda espectrofotomètricament. El grau d'interferència es va mesurar com el percentatge de la desviació respecte el pendent ideal, es a dir 1. Un pendent superior a aquest valor implica la sobreestimació de la concentració real, mentre que valors inferiors indiquen una subestimació. La interferència més elevada es va obtenir per la BCl *c* (52%) i la BCl *d* (39%), com a reflex de la similitud espectral esmentada (Taula 5.5). En el cas de la BCl *e* i la BCl *a* les interferències són menors, de l'ordre del 20% i el 6%, respectivament. La quantificació

espectrofotomètrica de la BCl *a* no es veu apenes afectada per la presència d'altres pigments en la mostra, ja que la longitud d'ona de mesura (775 nm) està molt allunyada de les de la resta de pigments clorofil·lics (entre 645 i 665 nm).

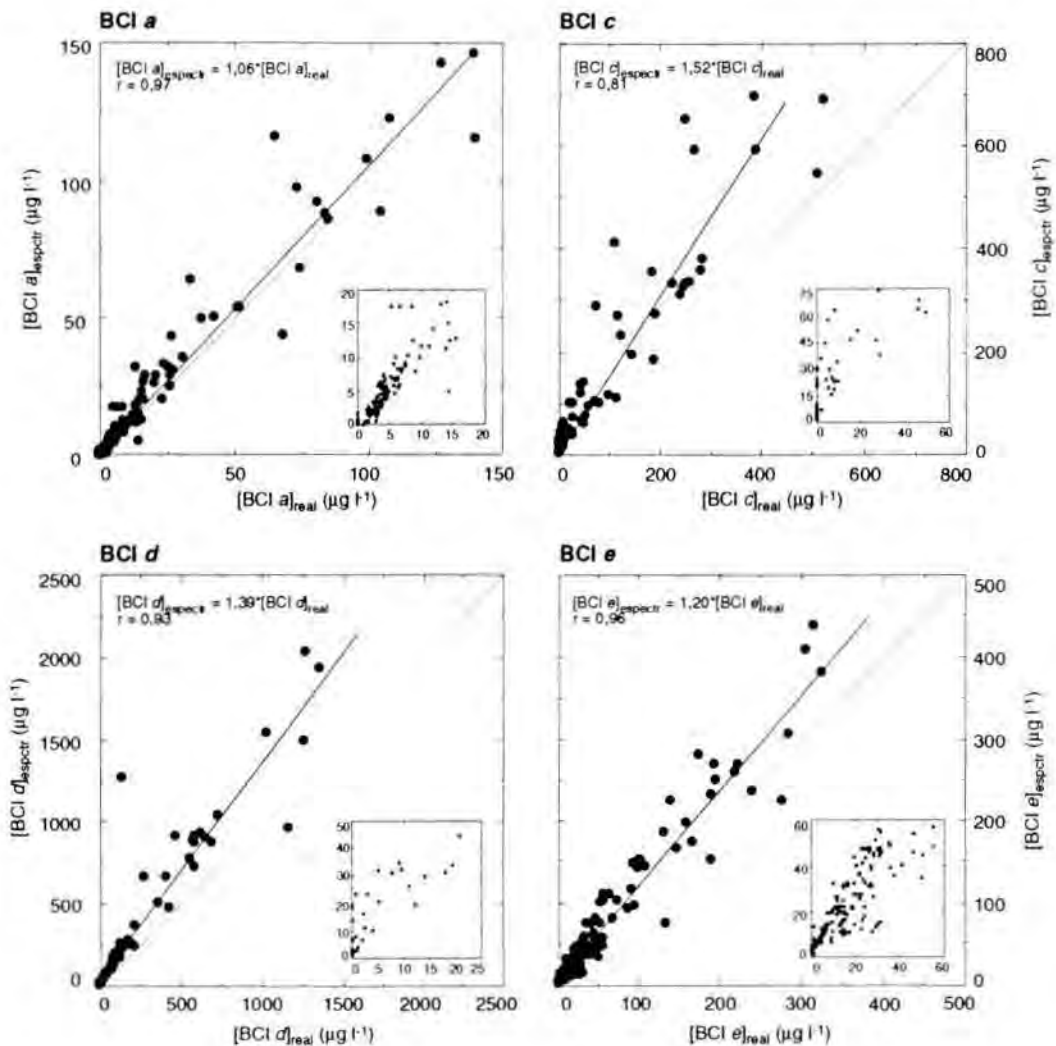


Figura 5.32. Relació entre la concentració real de pigment (mesurada amb HPLC) i la concentració mesurada a l'espectrofotòmetre en mostres de la cubeta III, la cubeta IV i l'estanyol Coromina. En tots els casos, la determinació espectrofotomètrica va resultar en una sobrestimació de la concentració real de pigment, tant o més elevada com més gran és el solapament entre el pigment en qüestió i la Cl *a*. El gràfics insertats mostren ampliacions de la relació obtinguda a baixes concentracions de pigment. La línia gris representa el pendent ideal (1).

Figure 5.32. Relation between the actual concentration of pigment (measured by HPLC) and the corresponding concentration measured by spectrophotometry in natural samples from C-III, C-IV and Coromina lagoon. In all cases, spectrophotometrical analysis resulted in an overestimation of the actual concentration, which is higher as bigger the overlapping between the absorption spectra of the pigment involved and that of Chl *a* is. Inserts show amplifications of the relation at low concentrations of pigment. Gray line indicates the optimal slope (1).

Taula 5.5. Sobreestimació (en %) resultant de la determinació espectrofotomètrica de les concentracions reals de les diferents BCl's en mostres naturals amb Cl *a* (veure text). La sobreestimació és més elevada com més similar és l'espectre d'absorció de la BCl corresponent amb l'espectre de la Cl *a*.

Table 5.5. Overestimate (in %) resulted from spectrophotometrical determination of the actual bacteriochlorophylls concentration in natural samples containing Chl *a*. Overestimate is higher as more similar the absorption spectrum of the correspondent BChl to that of Chl *a* is.

Pigment	% Sobreestimació	λ max. (nm)	
		Soret	Q_y
Cl <i>a</i>	–	430–432	663–666
BChl <i>c</i>	52	430–436	663–668
BChl <i>d</i>	39	427–429	654–656
BChl <i>e</i>	20	465–475	648–654
BChl <i>a</i>	6	363–365	770–775

Les distribucions verticals de les concentracions de bacterioclorofil·les que es van obtenir amb espectrofotòmetre i amb HPLC no va mostrar diferències importants (Figura 5.33). Malgrat això, en alguns ecosistemes es poden cometre fàcilment errors d'interpretació si no s'utilitza l'anàlisi cromatogràfica. L'estanyol Coromina constitueix un bon exemple, degut a la presència simultània de dues poblacions d'espècies verdes, *Pelodictyon clathratiforme* i "Chlorochromatium aggregatum", amb pigments fotosintètics (BChl *d* i BChl *c*, respectivament) espectralment similars. La dificultat de discriminar espectrofotomètricament ambdós pigments donava com a resultat que la població minoritària, "Chlorochromatium aggregatum", quedés emmascarada en els perfils verticals per la població dominant de *P. clathratiforme* (Figura 5.33.C). Un problema afegit seria la sobreestimació de les concentracions reals de Cl *a* en l'hipolimnion degut a la presència de BCl's, que, en aquest cas, van ser del 500%. Tradicionalment, els ecòlegs microbians han discriminat entre la Cl *a* activa (associada a poblacions fitoplanctòniques) d'aquella Cl *a* residual (derivada de la sedimentació) a partir dels perfils d'oxigen i sulfhídric i les característiques ecofisiològiques de les espècies algals estudiades. La utilització rutinària de la cromatografia líquida acaba amb la necessitat d'aplicar aquest criteri.

5.3.2. Significació ecològica de la variació qualitativa del contingut en pigments antena en poblacions de bacteris verds

En el capítol anterior s'ha demostrat que en condicions de laboratori els bacteris verds del sofre s'adapten al creixement a intensitats baixes de llum mitjançant dos mecanismes: i) un de quantitatiu, on s'incrementa el contingut general de pigments antena i, ii) un de qualitatiu, basat en el enriquiment selectiu de l'antena fotosintètica

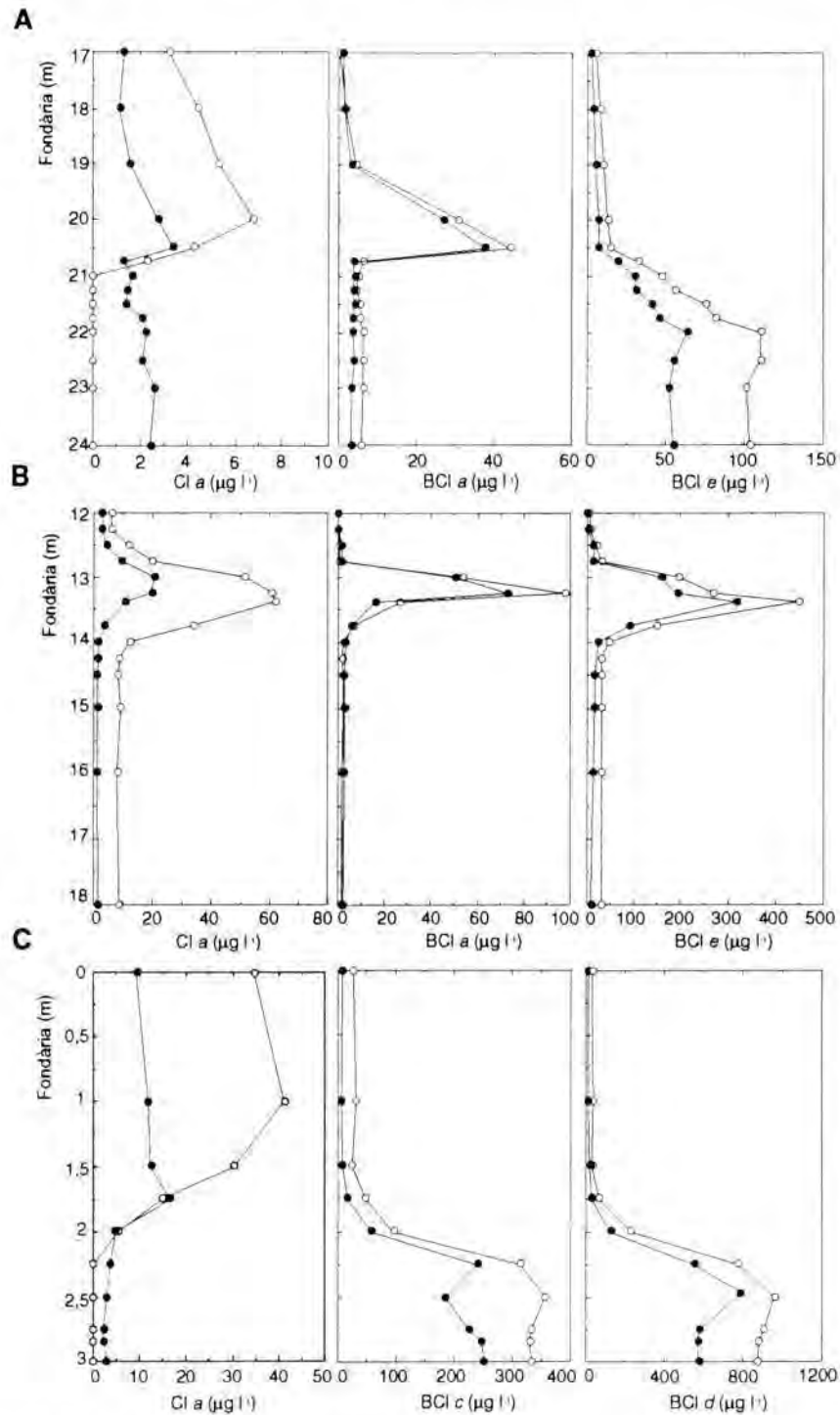


Figura 5.33. Distribució vertical de la concentració, mesurada amb HPLC (●) i espectrofotometre (○), dels diferents pigments fotosintètics a (A) C-III, (B) C-IV i (C) l'estanyol Coromina en el moment de màxima densitat bacteriana.

Figure 5.33. Vertical distribution of pigment concentrations, measured by HPLC (●) and spectrophotometer (○), in (A) C-III, (B) C-IV, and (C) Coromina lagoon during the period of the maximal bacterial density.

en homòlegs de les BCl's més alquilats. Calia considerar doncs, si aquests mecanismes fotoadaptatius es donaven també en poblacions naturals, on les condicions lumíniques de creixement són crítiques, no solament des del punt de vista quantitatiu sinó també qualitatiu.

Totes les poblacions naturals de bacteris verds del sofre investigades presentaven un patró d'homòlegs diferent al de les mateixes espècies crescudes en condicions òptimes al laboratori. La similitud d'aquests patrons naturals (caracteritzats per un elevat contingut en homòlegs més alquilats) amb els obtinguts al laboratori sota condicions de llum sub-òptimes i crítiques, suggereix que el re-arranjament d'homòlegs és un fenomen present en poblacions naturals. Tot i que el CRH d'una població depèn tant de l'espècie com del seu fisiològic, la diversitat de patrons naturals observada suggereix l'existència de dues estratègies fotoadaptatives. En condicions naturals, les espècies verdes semblen disposar d'una estratègia basada en la presència de formes derivades de la BCl *d*, tot i que, en alguns casos, el re-arranjament d'homòlegs també és present. Les espècies marrons, en canvi, basen la seva adaptació en l'enriquiment selectiu dels homòlegs de la BCl *e*.

5.3.2.1. Espècies verdes

Les poblacions naturals constituïdes únicament o parcial per espècies verdes són abundants en llacs poc profunds, on la localització de la interfase O_2/H_2S no supera els 8 m (Montesinos *et al.*, 1983; Montesinos i van Gemerden, 1986; Vila i Abella, 1994; van Gemerden i Mas, 1995). En general, les espècies que constitueixen aquestes poblacions solen posseir BCl *d*, essent escasses o minoritàries dins la comunitat les espècies amb BCl *c* (van Gemerden i Mas, 1995). Els llacs nord-americans i l'estanyol Coromina són bons exemples d'aquesta selecció, ja que en la majoria d'aquests ecosistemes la comunitat fotosintètica estava dominada per espècies amb BCl *d* o formes derivades.

Malgrat que Broch-Due i Ormerod (1978) postulen un hipotètic avantatge davant situacions de limitació lumínica d'un mutant de *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum* amb BCl *c* respecte la soca salvatge amb BCl *d*, els resultats presentats no només no estan d'acord amb aquesta hipòtesi sinó que suggereixen el contrari, es a dir, que les espècies amb BCl *d* estan més ben adaptades a les baixes intensitats de llum. Això es veuria recolzat per dos fets: i) que mai es van observar poblacions naturals de *Chlorobium vibrioforme* amb BCl *c* i, ii) que les poblacions estudiades posseïen formes de BCl *d* (BCl *d'* o BCl *d''*) diferents a la de la soca NCIB 8327 de *C. vibrioforme* estudiada per Broch-Due i Ormerod que, a més, és la mateixa soca utilitzada en aquest treball (Capítol 3). La presència d'aquestes formes de BCl *d* sembla estar relacionada, doncs, amb la fotoadaptació de les espècies verdes. Tot i que les diferències estructurals entre la BCl *d'* i BCl *d''* respecte la BCl *d* s'haurien de confirmar per espectroscòpia de masses, aquestes podrien consistir tant en un major grau d'alquilació de l'anell tetrapirròlic com en la presència d'alcohols esterificats diferents del farnesil. Ambdues modificacions han estat apuntades com adaptacions de l'antena fotosintètica bacteriana a condicions de baixa intensitat de llum (Caple *et al.*, 1978; Blankenship *et al.*, 1988; Bobe *et al.*, 1990; Huster i Smith, 1990; Ormerod *et al.*, 1993).

L'anàlisi comparativa de la composició en homòlegs de la BCl *d'* en les poblacions de l'estanyol Coromina i les dels llacs nord-americans, ha demostrat que en les

espècies verdes també es donen canvis en el contingut relatiu dels homòlegs majoritaris. Mentre que en la població de l'estanyol Coromina, l'homòleg BCl d'_1 representava més del 50% del total, en els llacs d'EEUU l'homòleg predominant fou BCl d'_2 (55%). D'acord amb la hipòtesi de l'optimització de l'antena fotosintètica mitjançant l'enriquiment en homòlegs més alquilats (Capítol 4), aquestes diferències en el CRH s'atribuirien a unes crítiques condicions lumíniques. La llum que arribava a la comunitat de bacteris verds en els llacs nord-americans estava alterada, en la majoria dels casos, per l'absorció selectiva de les poblacions fotosintètiques localitzades en zones superiors, principalment cianobacteris i Cromatiàcies. La intensitat de llum incident a la làmina bacteriana en aquests llacs era doncs, considerablement més baixa (entre el 0,013% i el 0,1% de la incident en superfície) que la mesurada a l'estanyol Coromina (0,4-1,7%) on l'ombregat era menys acusat. Atenent a aquestes diferències, sembla probable que l'enriquiment en BCl d'_2 estigui relacionat amb la fotoadaptació de les espècies verdes, tot i que mancaria una confirmació experimental al laboratori similar a la realitzada amb les espècies marrons. Dissortadament, les espècies verdes investigades (*Pelodictyon clathratiforme*, "Chlorochromatium aggregatum" i *Chloronema* spp.) no s'han conseguit aïllar mai en cultiu pur i, per tant, la constatació experimental és difícil. Malgrat tot, seria desitjable que en un futur s'estudiés el paper que realitzen les noves formes de BCl d en el procés de fotoadaptació d'aquestes espècies.

5.3.2.2. Espècies marrons

La distribució vertical de les cèl.lules d'una mateixa població no és homogènia sinó que es distingeixen diferents estrats (*top*, *plate* i *bottom*) en funció dels factors limitants pel creixement i de l'estat fisiològic de les cèl.lules existents en cada zona (Guerrero *et al.*, 1985; van Gemerden *et al.*, 1985). Entre les cèl.lules d'aquests estrats s'estableixen diferències metabòliques, essent les cèl.lules de la part superior les més actives mentre que les de les zones inferiors tindrien una activitat escassa o pràcticament inexistent.

Aquesta heterogeneïtat intrapoblacional ve determinada per la distribució de la llum, que és alterada tant per l'auto-ombregat com pel filtre biològic que suposen altres poblacions fotosintètiques, i es veu reflexada tant per les diferències en els continguts de pigments antena (BCl i carotenoides) com en les distribucions verticals del contingut relatiu de BCl e_4 . En la zona de màxima densitat cel.lular, el contingut en BCl e_4 fou màxim, arribant a valors del 46% i del 43% a C-III i C-IV, respectivament. Per sobre aquesta zona, on la intensitat de llum incident és superior, els patrons d'homòlegs mostren continguts equivalents de BCl e_2 , BCl e_3 i BCl e_4 i, en alguns casos, es pot detectar BCl e_1 en percentatges molt baixos (<2%) (Figura 5.34). La presència d'aquest darrer homòleg en poblacions naturals és infreqüent, ja que només sol aparèixer en proporcions importants (10-20%) en condicions lumíniques saturants (Figura 5.35).

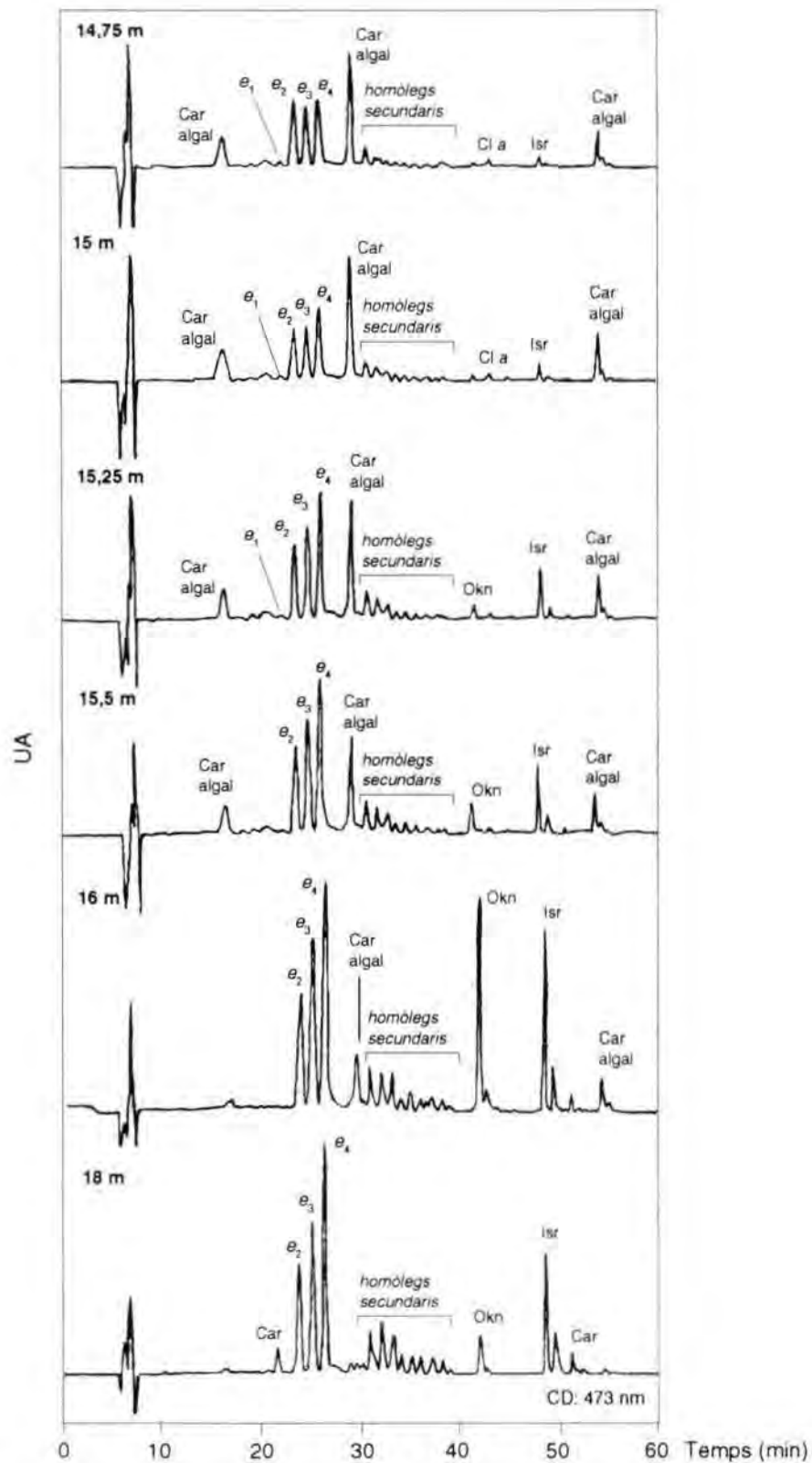


Figura 5.34. Perfil vertical de patrons cromatogràfics de la comunitat fotosintètica de C-III, on es mostra la progressiva desaparició del primer homòleg de la BChl e (BChl e_1) i el canvi en la composició de la resta d'homòlegs per part de la població de *Chlorobium phaeobacteroides*.

Figure 5.34. Vertical profile of HPLC traces corresponding to the photosynthetic bacterial community of C-III showing the progressive loss of BChl e_1 and the change in BChl e homolog composition by the *Chlorobium phaeobacteroides* population.

Per sota del màxim poblacional, en canvi, les baixes intensitats de llum ($< 0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) impedeixen el creixement, per la qual cosa, la composició pigmentària de l'aparell fotosintètic no es podria modificar doncs, per fer-ho, és indispensable el creixement cel·lular (Capítol 4). En aquestes capes profundes, les cèl·lules de *Chlorobium* no poden prosperar ni ocupar zones superiors, sinó que constitueixen una població residual confinada en fondària que es trobaria en trànsit de sedimentació i probablement, en diferents fases de degradació (Guerrero *et al.*, 1985). Aquest fet sembla confirmat per l'augment en les capes profundes d'ambdues cubetes de l'índex Car/BChl i del contingut relatiu d'homòlegs secundaris.

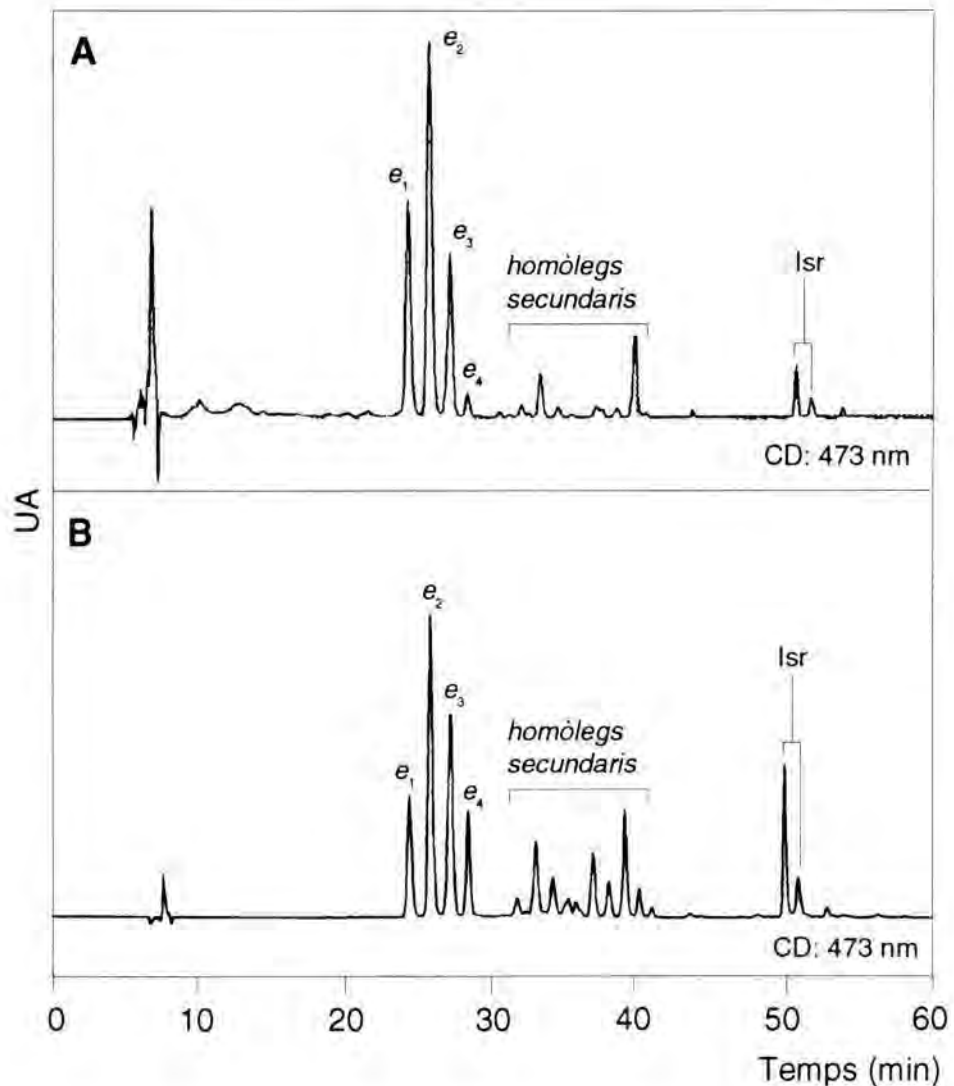


Figura 5.35. Patrons cromatogràfics d'extractes pigmentaris de (A) *Chlorobium phaeobacteroides* creixent en cultiu continu i (B) *Chlorobium phaeovibrioides* creixent en cultiu tancat, on es mostra l'elevat contingut en BChl e_1 . Ambdós cultius es van incubar a una intensitat de llum de $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figure 5.35. HPLC traces of pigments extracts of (A) *Chlorobium phaeobacteroides* growing in continuous culture, and (B) *Chlorobium phaeovibrioides* growing in a batch culture, showing the high content in BChl e_1 . Both cultures were incubated at saturating light intensities ($30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Durant el creixement de la població, l'increment de biomassa resulta en una progressiva reducció de la intensitat de llum disponible. Aquest fenomen d'ombrejat és més acusat en cas d'haver-hi altres poblacions fotosintètiques (fitoplàncton, cianobacteris o Cromatiàcies) situades més amunt (Vila i Abella, 1994; van Gemerden i Mas, 1995; Vila, 1996) i té conseqüències directes sobre el contingut pigmentari de la població bacteriana (Pedrós-Alió *et al.*, 1983). En les poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* de C-III i C-IV es va observar, a més de la variació vertical del CRH, un progressiu enriquiment en el contingut en BCl e_4 durant el creixement estacional i un augment del l'índex Car/BCl en la zona de la làmina bacteriana com a resultat de les variacions esmentades en el règim lumínic. Una altra conseqüència fou l'augment en el contingut en homòlegs secundaris a mida que la població envellia (Figura 5.36) fet que, si bé no es pot considerar pròpiament com una adaptació de l'aparell fotosintètic, sí es pot contemplar com el reflex d'un estat fisiològic deficient degut a les crítiques condicions lumíniques en les etapes finals de l'estudi.

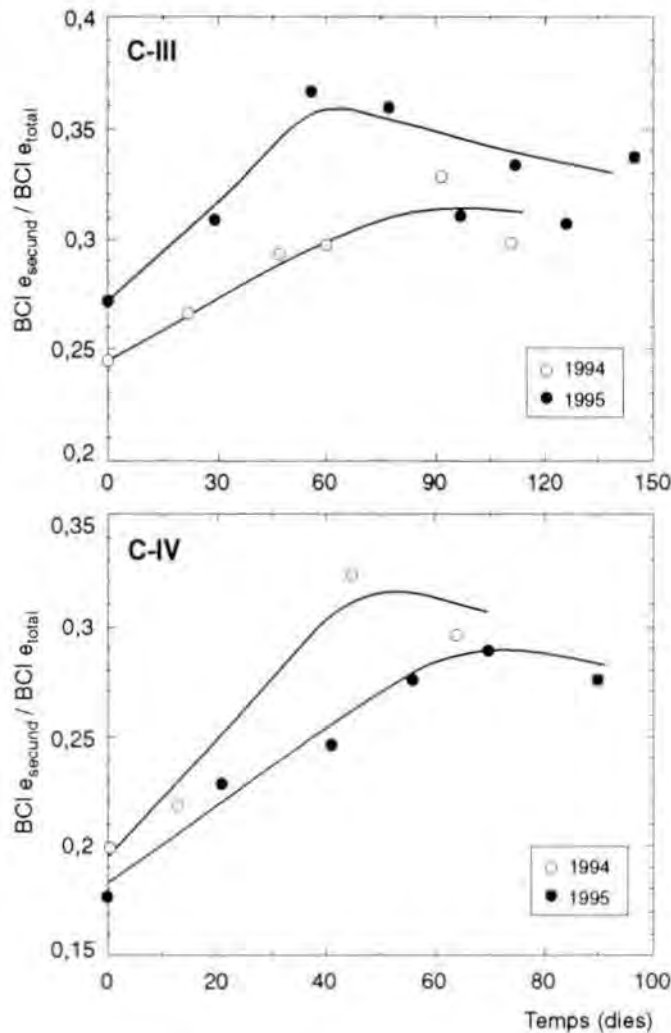


Figura 5.36. Evolució de l'índex entre la concentració integrada d'homòlegs secundaris de la BCl e i el total de BCl e a C-III i C-IV durant els dos períodes estudiats.

Figure 5.36. Evolution of the ratio between the integrated BChl e secondary homologs concentration and the total BChl e concentration in C-III and C-IV durant the study periods.

El creixement de la població sembla doncs, desembocar en una etapa final estable on el contingut pigmentari i, especialment, la composició dels homòlegs principals ja no mostra variacions significatives. Per arribar a aquesta fase final, la població s'ha adaptat progressivament a través de diferents CRH intermitjos. La composició de l'antena en cada moment seria l'òptima per les condicions lumíniques presents, i s'aconseguiria mitjançant l'enriquiment selectiu de BCl e_4 en detriment de BCl e_2 (Figura 5.37). Malgrat que la figura suggereix una conversió directe de BCl e_2 a BCl e_4 , aquesta és improbable considerant la base fisiològica del procés. Per la conversió d'un homòleg en l'altre calen dues metilacions seqüencials de BCl e_2 en el C-8 del macrocicle (Smith, 1991; Senge i Smith, 1995), que no sembla probable que es produeixin a l'interior del clorosoma ja que no s'hi han trobat els enzims corresponents (Chung *et al.*, 1994; Blankenship *et al.*, 1995). Sembla més factible pensar en una síntesi de nova BCl e_4 en l'exterior del complexe antena i el seu transport posterior a l'interior, on ja no estaria disponible per la modificació.

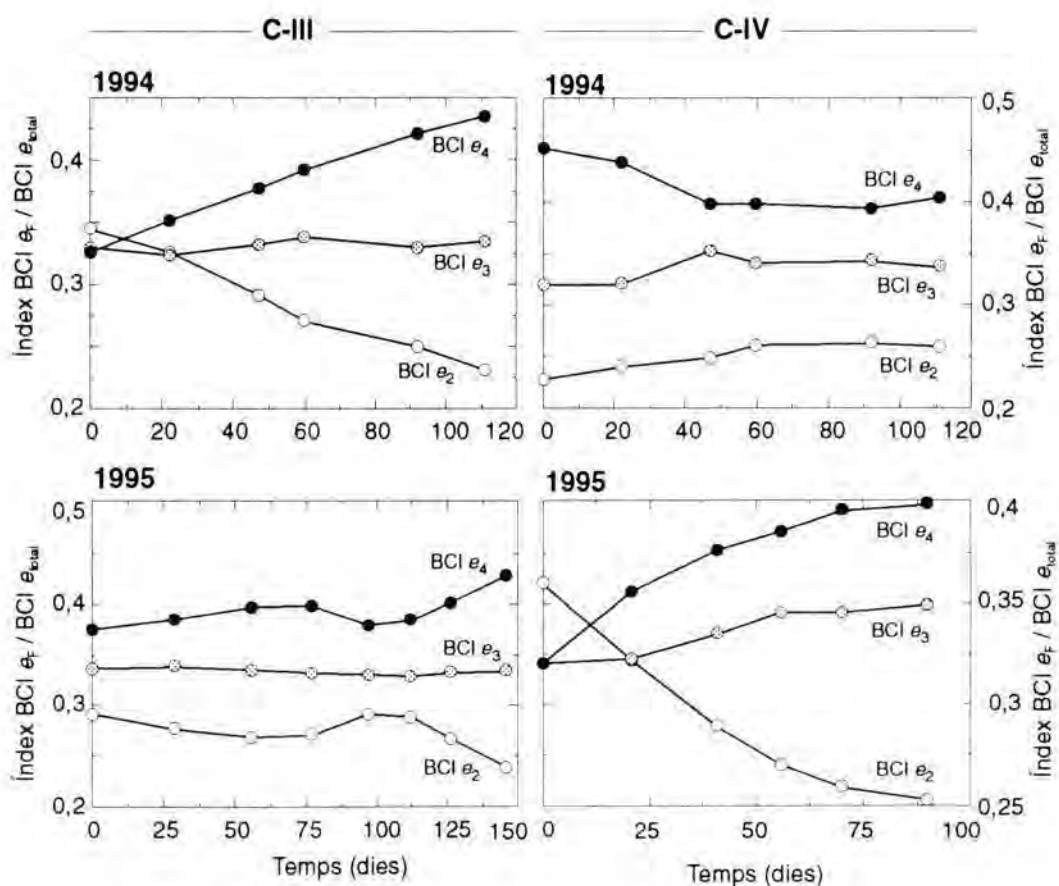


Figura 5.37. Evolució dels índex entre les concentracions integrades dels tres homòlegs principals i el total de BCl e a C-III i C-IV durant els dos períodes estudiats.

Figure 5.37. Evolution of the ratio between the integrated concentration of the main BChl e homologs and the total BChl e concentration in C-III and C-IV during the study periods.

Finalment, cal considerar la utilitat que es desprèn, des del punt de vista de l'adaptació lumínica, dels canvis composicionals en l'antena fotosintètica de les poblacions naturals. La qüestió a resoldre és si l'enriquiment en homòlegs més alquilats resulta en un avantatge selectiu en front d'altres poblacions. La variació vertical i temporal del CRH va coincidir amb un desplaçament del màxim d'absorció *in vivo* de la població (Taula 5.6) similar a l'observat en cultius de *Chlorobium phaeobacteroides* incubats a intensitats de llum baixes (Capítol 4). En condicions naturals, l'alteració selectiva de la llum en profunditat sembla adjudicar una certa utilitat al desplaçament del màxim d'absorció de l'antena fotosintètica, ja que aquest es podria produir cap a la longitud d'ona prevalent. Tot i que aquest mecanisme podria resultar clau per l'adaptació de la població, és improbable que es doni. La llum que arriba a la població de *Chlorobium* sol comprendre un rang espectral molt estret (entre 550 i 600 nm) (Vila i Abella, 1994; Vila, 1996) i, per tant, una modificació del màxim Q_y (≈ 723 nm) de 9 nm no es pot traduir en una millora quantitativa de l'absorció. El desplaçament del màxim d'absorció de l'antena no s'ha de considerar, doncs, una adaptació de la població per absorbir més llum, sinó com una regulació que permet optimitzar la llum disponible mitjançant l'increment de les taxes amb que la poca energia absorbida és transferida als centres de reacció. Per provar aquesta hipòtesi caldria mesurar les taxes específiques de transferència d'energia, tant en poblacions naturals com en cultius de laboratori.

5.3.3. Els patrons pigmentaris com a indicadors eco-fisiològics

Els patrons d'homòlegs de les poblacions de bacteris verds del sofre investigades estan inequívocament relacionats amb les condicions de creixement. Això fa que aquests patrons pigmentaris adquireixin importància com a indicadors de l'estat fisiològic de la població i, a més, aportin informació sobre aspectes ecològics importants.

Per analitzar les similituds entre els continguts d'homòlegs de les poblacions d'ecosistemes diferents, es va recórrer a l'anàlisi de components principals (PCA). Aquesta anàlisi estadística va permetre agrupar totes aquelles mostres –els continguts d'homòlegs “tipus” (o *patró*)– que tenien una mateixa proporció d'homòlegs. A partir de l'agrupament que se'n derivés, es podien extreure conclusions eco-fisiològiques sobre la presència d'un tipus de patró en un determinat ecosistema o fase de desenvolupament concreta. Per l'anàlisi, es van utilitzar els valors del CRH de la BCl *e* obtinguts per tots aquells llacs i estanyols on s'havien descrit poblacions d'espècies marrons dels bacteris verds del sofre. Les poblacions naturals d'espècies verdes no es van considerar per l'anàlisi atès que els patrons d'homòlegs de la BCl *c* i *d* no són comparables amb els de la BCl *e* i, a més, mostren poca variabilitat degut a l'escassa capacitat mostrada per les espècies verdes per modificar el contingut d'homòlegs. Les poblacions d'espècies marrons analitzades foren: *Chlorobium phaeobacteroides* (C-III, C-IV, Vilar-I i Vilar-II i l'Estanyol Sisó a Banyoles), *Chlorobium phaeovibrioides* (Es Gorg de Canyamel i Es Cibollar a Mallorca), *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (llacs Buchensee i Schleinsee a Alemanya i Höllerersee i Langsee a Àustria) i *Pelochromatium roseum* (llacs Cassidy, Crystal, Lefevre, Little Long, Little

Mill, Little Silver, Mirror, Silver, Warner i Wood als Estats Units). En aquells casos en què es disposava d'un seguiment estacional de les poblacions (C-III i C-IV) es van obtenir els patrons característics per cada fase del creixement. Així, es va establir un patró d'homòlegs corresponent a les fases inicials (maig), les fases intermitges (juliol) i les fases finals (setembre i octubre) del desenvolupament de les poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* a les cubetes III i IV. En aquells

Taula 5.6. Desplaçament del màxim Q_y de la BChl *e* amb la fondària detectat en les poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* desenvolupades a C-III i C-IV.

Table 5.6. Shift of the BChl *e* Q_y absorption maximum detected at different depths from *Chlorobium phaeobacteroides* growing in C-III and C-IV.

C-III	27-6-94		10-7-94		11-8-94	
	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)
	15,8	716	16,0	721	16,0	720
	16,0	720	16,5	721	16,5	720
	16,8	724	17,0	724	17,0	720
	17,5	725	17,5	722	17,5	720
	18,0	723	18,0	723	18,0	717
	25-5-95		20-7-95		30-8-95	
	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)
	19,0	717	20,0	720	19,0	722
	20,0	717	21,0	720	20,0	723
	21,0	722	21,5	721	21,0	722
	22,0	724	22,0	724	22,0	721
	23,0	724	24,0	724	24,0	721
C-IV	27-6-94		10-7-94		30-8-94	
	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)
	13,0	715	13,0	715	13,0	717
	13,5	718	13,5	721	13,2	721
	15,0	720	14,0	720	13,7	722
	17,0	721	15,0	721	14,0	722
	18,0	720	18,0	721	16,0	72
	30-8-95		28-9-95		18-10-95	
	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)	F (m)	Q_y (nm)
	13,0	713	13,0	723	12,5	722
	13,5	723	13,5	724	13,0	724
	14,0	724	13,8	725	13,5	725
	16,0	724	14,0	726	14,	721
	17,0	723	17,0	723	17,0	723

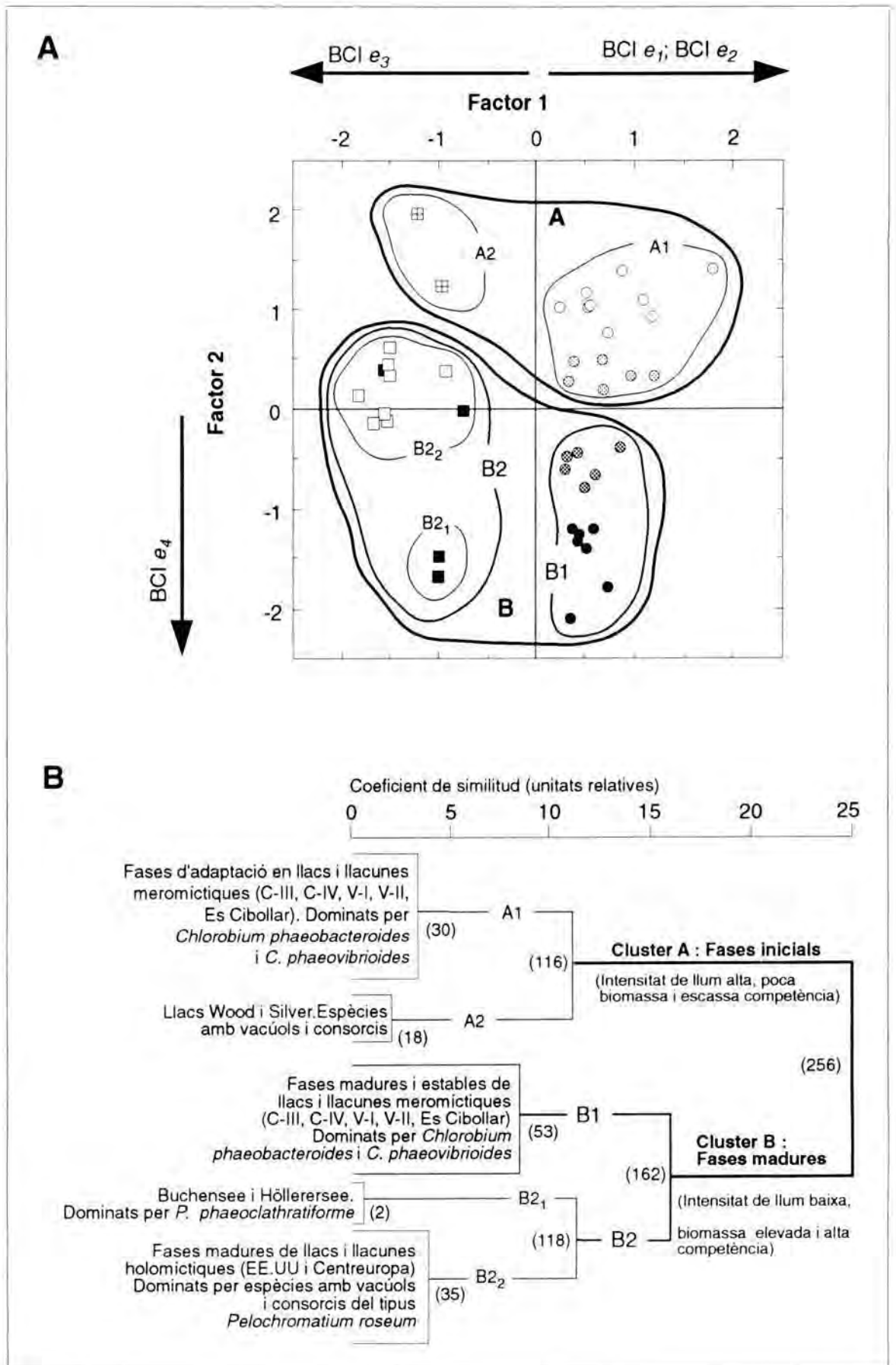
ecosistemes mostrejats puntualment (resta d'estanyols de Banyoles -Vilar, Sisó-, llacunes costaneres de Mallorca i els llacs centreeuropeus i nord-americans) es va obtenir el patró tipus de la població tot i que fou més difícil determinar el moment del desenvolupament en que es trobava aquesta. El criteri per determinar el patró tipus d'entre les diferents fondàries fou el d'obtenir la mitjana dels continguts relatius de cada homòleg mesurats en la zona de la làmina bacteriana.

L'anàlisi es va realitzar sobre quatre variables corresponents a les concentracions relatives (en %) de cadascun dels quatre homòlegs de la BCl *e*. Això va resultar en l'agrupació d'aquests valors en base a dos factors: un Factor 1 (eix horitzontal) relacionat negativament amb BCl e_3 (-0,98) i positiva amb BCl e_1 (0,44) i BCl e_2 (0,71) i un Factor 2 (eix vertical) relacionat negativament amb BCl e_4 (-0,99). La baixa correlació de BCl e_1 és deguda a l'escassa presència d'aquest homòleg en poblacions naturals. La representació gràfica de l'agrupament revela dos *clusters* clarament separats (A i B) (Figura 5.38.A). Dins el *cluster* A es poden distingir dos subgrups: l'A1, caracteritzat per un elevat contingut en BCl e_2 i, en alguns casos, concentracions significatives de BCl e_1 ; i el subgrup A2 on l'homòleg predominant és BCl e_3 (Figura 5.39). El *cluster* B inclou també dos subgrups, el B1, que agrupa mostres amb concentracions creixents de BCl e_4 , i el B2, caracteritzat per continguts elevats de BCl e_3 i BCl e_4 .

El subgrup A1 inclou les mostres corresponents a les fases inicials de desenvolupament de les poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* i *C. phaeovibrioides* a les cubetes de l'estany de Banyoles, l'estanyol del Vilar, el Sisó, i les llacunes costaneres de Mallorca. Aquestes etapes de desenvolupament es caracteritzen per intensitats de llum altes (1-10% de la llum incident en la superfície), poca biomassa i escassa competència amb d'altres poblacions fotosintètiques (Figura 5.38.B). Altres característiques serien les condicions reductores suaus i les baixes concentracions de sulfhídric pròpies de les fases inicials de l'estratificació. Aquestes etapes però no són estables i donen pas gradualment a condicions reductores més fortes i un augment en les concentracions de sulfhídric. Això fa augmentar la biomassa poblacional i l'auto-ombrejat, fet que provoca una reducció dràstica de la intensitat de llum disponible (<0,1% de la llum incident) i un increment de la competència amb altres poblacions fotosintètiques, ja siguin eucariotes (fitoplàncton) o procariotes (Cromatiàcies). Aquest procés va lligat a una adaptació pigmentària que passa per

Figura 5.38. Pàgina següent. (A) Agrupament, mitjançant una anàlisi de components principals, de les mostres corresponents a patrons d'homòlegs de poblacions naturals d'espècies marrons de bacteris verds del sofre en base a la seva similitud en quant a la proporció dels quatre homòlegs de la BCl *e* (veure text). (B) Dendrograma de distàncies entre grups (re-escalat a 25) obtingut a partir del coeficient de similitud (entre parèntesi) calculat en l'anàlisi de components principals.

Figure 5.38. Facing page. (A) Cluster groups resulted from the PCA of BChl *e* homolog patterns of natural populations of brown species of green sulfur bacteria (see text). (B) Dendrogram using average linkage between groups (rescaled distance to 25) obtained from the similarity coefficient (in brackets) calculated by PCA.



l'increment, en el cas de *Chlorobium phaeobacteroides* i *Chlorobium phaeovibrioides*, del contingut en BCl e_4 (Figura 5.39). En la figura 5.38.A, les mostres corresponents a aquestes etapes finals es troben agrupades dins el subgrup B1, com a evolució lògica de les mostres que inicialment es trobaven dins A1. Aquest component temporal lligat al Factor 2 (eix vertical) és més evident encara observant els diferents estadis intermitjos d'algunes d'aquestes poblacions (Figura 5.38.A, cercles grisos).

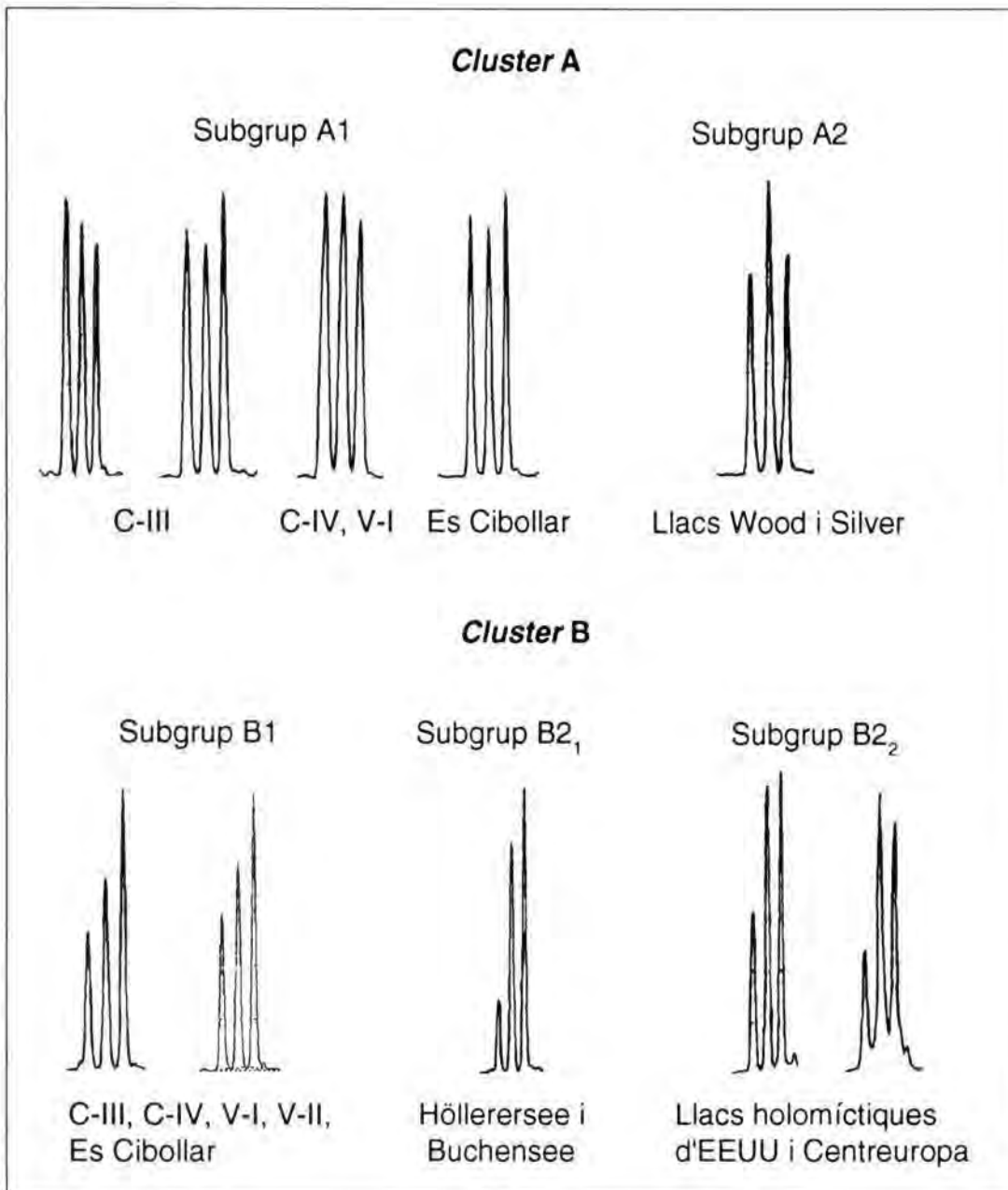


Figura 5.39. Patrons cromatogràfics dels quatre homòlegs principals de la BCl e representatius per cadascun dels subgrups obtinguts en l'anàlisi de components principals.

Figure 5.39. Representative HPLC BChl e homolog patterns for the different clusters obtained in the PCA.

Des d'un punt de vista fotoadaptatiu no caldria esperar massa diferència entre les diverses mostres agrupades en el *cluster* B, doncs la intensitat de llum *in situ* per totes elles era inferior al 0,01% de la llum incident en superfície. Malgrat això, s'observen diferències atribuïbles a la composició específica de la comunitat fotosintètica en cadascun dels ecosistemes. El subgrup B1 està format per mostres corresponents a les fases finals de les cubetes de l'estany de Banyoles i estanyols similars –tots ells meromíctics, amb gradients químics forts i condicions reductores intenses– dominats per *Chlorobium phaeobacteroides* o *C. phaeovibrioides* en el cas de les llacunes costaneres (Figura 5.38.B). En canvi, les mostres incloses dins els subgrups B2₁ i B2₂ provenen d'estanyols holomíctics caracteritzats per gradients suaus, concentracions de sulfhídric baixes i zones de transició amples, dominats per espècies marrons amb capacitat de moviment vertical com ara *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (llacs Centreuropa, Subgrup B2₁) o consorcis marrons com “*Pelochromatium roseum*” (llacs d'EE.UU., Subgrup B2₂).

El subgrup A2, constituït per les mostres dels llacs Wood i Silver als EEUU, presenta uns patrons pigmentaris més similars als obtinguts en les mostres del subgrup A1 que no pas als del subgrup B22, on s'agrupen la resta de llacs americans amb característiques limnològiques similars. Una explicació seria que la població desenvolupada en aquests llacs es trobava en condicions inicials de desenvolupament (Figura 5.39). Una explicació alternativa seria que la població present en aquests llacs fós d'una espècie diferent a les de la resta d'ecosistemes i disposés, per tant, d'un altra tipus d'estratègia adaptativa.

Si bé la distribució obtinguda amb l'anàlisi de PCA no explica la dominància d'una espècie bacteriana en un ecosistema concret (això es basaria tant en les condicions fisico-químiques imperants com en els requeriments fisiològics de la pròpia espècie), sí constata la seva presència i, a més, posa de manifest les diferències pigmentàries entre les poblacions. Una anàlisi d'aquest tipus és converteix doncs, en una valuosa eina tenint en compte que la composició pigmentària d'una determinada població és el reflex tant del règim lumínic sota el que està creixent com del seu estat fisiològic. L'obtenció dels patrons pigmentaris de les comunitats bacterianes fotosintètiques mitjançant HPLC no només possibilita l'estudi acurat dels diferents pigments, sinó que ofereix informació valuosa des del punt de vista ecològic, fet que, al nostre entendre, significa un pas endavant en l'estudi de la fisiologia pigmentària dels microorganismes fotosintètics en general i dels bacteris verds en particular.

6. DISCUSSIÓ GENERAL



6. DISCUSSIÓ GENERAL

Els bacteris verds del sofre, especialment les espècies marrons, es poden considerar com els microorganismes fotosintètics que millor s'adapten a viure sota condicions limitants de llum. S'han descrit casos extrems de poblacions de *Chlorobium phaeobacteroides* creixent a 80 m de profunditat al Mar Negre, on la intensitat de llum és de l'ordre de $0,003 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que representa un 0,0005% de la llum incident a la superfície (Repeta *et al.*, 1989; Overmann *et al.*, 1992). Aquesta bona adaptació de les espècies marrons a intensitats baixes de llum s'ha atribuït a la presència de carotenoides, en aquest cas l'isorenieratè, que permeten l'absorció de la llum en aquelles longituds d'ona predominants a la fondària on es localitza la població (Montesinos *et al.*, 1983; Abellà *et al.*, 1980). Montesinos (1982) ja va destacar la relació inversa de l'índex Car/BChl amb la disponibilitat de llum, tant en poblacions naturals de bacteris verds del sofre com en cultius de laboratori. En el nostre cas s'ha observat una relació similar, tot i que els valors d'aquest índex corresponents a cultius de laboratori de *Chlorobium phaeobacteroides* foren lleugerament inferiors (entre 0,3 i 0,5) als calculats en les poblacions naturals de la mateixa espècie (entre 0,4 i 1,1 en la làmina bacteriana). Això sembla confirmar el fet que, malgrat la co-regulació de la síntesi d'ambdós pigments, la síntesi d'Isr es veu estimulada en condicions naturals per tal d'aprofitar al màxim la llum incident, alterada espectralment.

Aquesta estratègia basada en els carotenoides sembla contradictòria atès l'elevada diversitat en bacterioclorofil·les antena de la que disposen els bacteris verds del sofre. Ormerod i col.laboradors (1993) ja es plantejaren el perquè de la síntesi massiva de bacterioclorofil·les si la principal funció d'absorció lumínica correspon als carotenoides. La resposta a aquesta pregunta cal buscar-la en la pròpia fisiologia del procés adaptatiu, on resulta fonamental la re-distribució del contingut d'homòlegs.

L'eficiència dels carotenoides en l'absorció de la llum a elevades profunditats resulta òbvia, doncs la llum que arriba a aquestes fondàries està exhaurida en aquelles longituds d'ona que poden ser absorbides per les bacterioclorofil·les (Vila i Abella, 1994; Vila, 1996). De fet, les modificacions en el màxim d'absorció de les BChl antena en la zona Q_y (Apartat 4.3.3) no asseguren una millora en l'absorció de la llum senzillament perquè, en condicions naturals, rarament hi ha llum disponible per sobre de 600 nm. Si a això, afegim el fet que la intensitat de llum aprofitable que arriba a la làmina bacteriana és generalment molt baixa ($< 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), queda clar que les poblacions naturals es troben sota condicions d'il·luminació sub-òptimes i crítiques. En aquestes condicions, la població bacteriana només pot prosperar si la poca llum absorbida pels carotenoides resulta rentable en termes d'eficiència. Per que això es doni, l'energia absorbida s'ha de transferir ràpidament i eficient als centres de reacció. Atès que el solapament entre l'espectre de fluorescència dels carotenoides (Cbt i Isr) amb l'espectre d'absorció de la BChl *a* de la làmina basal dels clorosomes és nul, la transferència d'energia necessita de molècules enllaç, es a dir, les molècules de BChl antena (*c*, *d* i *e*). És precisament en aquest punt on l'elevada diversitat pigmentària –en forma de diferents homòlegs i/o agregats– pot jugar un

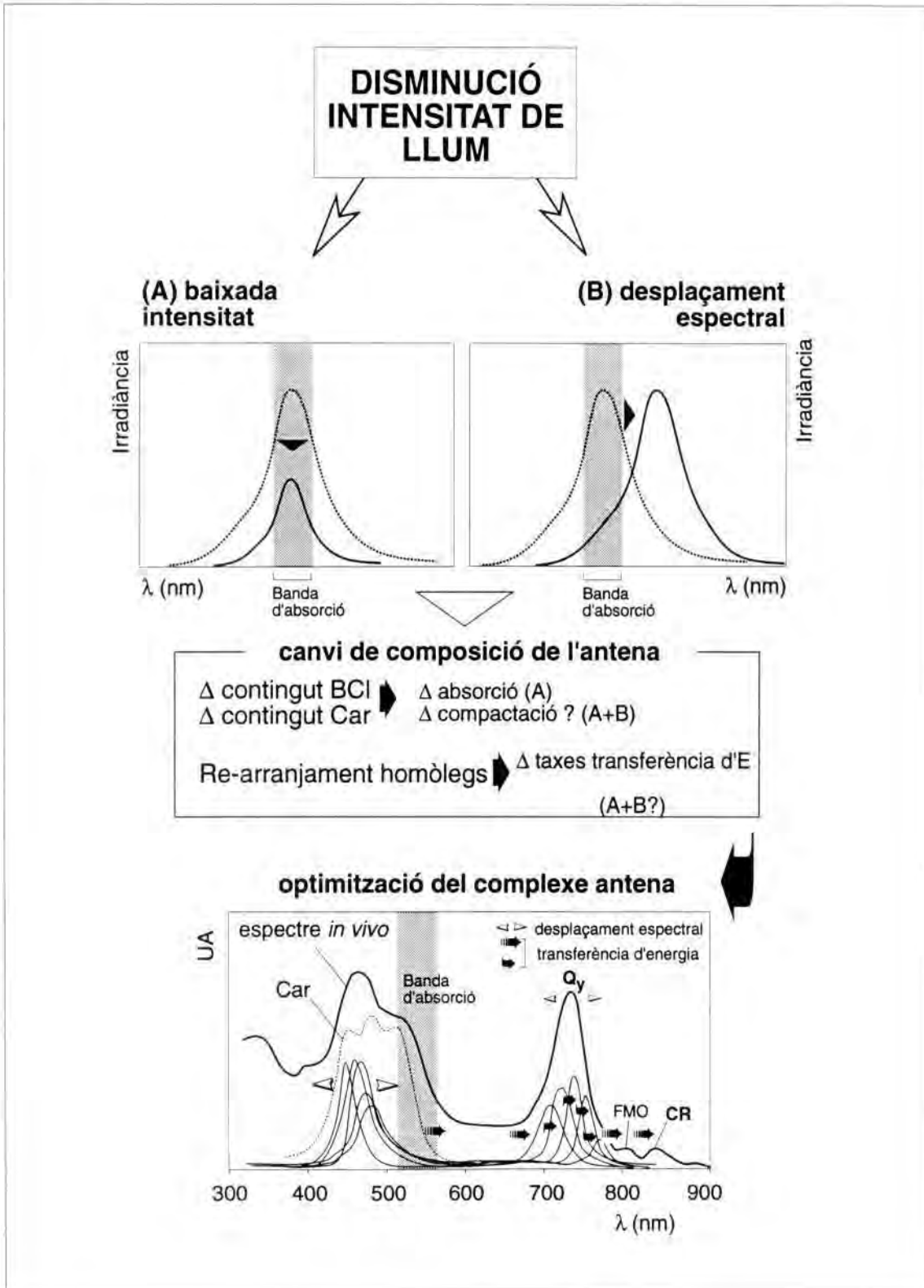


Figura 6.1. Possibles vies d'adaptació de l'antena fotosintètica dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum (veure text).

Figure 6.1. Possible adaptation mechanisms of the photosynthetic antenna of green sulfur bacteria to low light intensities (see text for details).

paper decisiu. El re-direccionament de la síntesi de pigments cap a la producció selectiva d'homòlegs més alquilats, permetria optimitzar l'eficiència del procés de transferència ja que canalitzaria l'energia absorbida fins el centres de reacció (Figura 6.1). La presència de components minoritaris dins l'antena, amb màxims d'absorció a longituds d'ona llargues, ha estat suggerida per diferents autors com un mecanisme adaptatiu per concentrar excitons a la proximitat dels centres de reacció (Fetisova *et al.*, 1988; Fisher i Hoff, 1992; Trissl, 1993; Trissl *et al.*, 1993). A banda d'això, els canvis en el grau de metilació dels diferents homòlegs, permeten la formació de diferents tipus d'agregats que facilitarien l'empaquetament d'un nombre més elevat de molècules dins els clorosomes, fet que també repercutiria en una major eficiència fotosintètica.

En aquest punt cal fer unes consideracions pel que fa la poca capacitat de les espècies verdes en prosperar sota climes lumínics baixos. Si bé aquest fet podria ser degut a la poca disponibilitat d'aquestes espècies a modificar el seu contingut en homòlegs (Capítol 4), s'ha de tenir en compte que els espectres de fluorescència de la BCl *c* (i la *d*, en menys mesura) presenten un major solapament amb els espectres d'absorció de la BCl *a* de la làmina basal que no pas el de la BCl *e* de les espècies marrons. D'acord amb això, les espècies verdes són més eficients en termes de transferència d'energia que les marrons (Blankenship *et al.*, 1985). El fet que no estiguin ben adaptades a créixer en condicions de limitació lumínica constitueix, des d'aquest punt de vista, una paradoxa. L'explicació a aquest contrasentit vindria donada per l'extremadament baix contingut de carotenoides (Cbt) inherent a les espècies verdes. Els índex Car/BCl en *Chlorobium limicola* i *C. chlorovibrioides* són deu vegades inferiors (0,08 i 0,05, respectivament) als calculats per *Chlorobium phaeobacteroides* o *C. phaeovibrioides* en les mateixes condicions d'il·luminació (0,51 i 0,41, respectivament). Aquest fet limita la capacitat de les espècies verdes d'absorbir la llum disponible i, com a conseqüència, el seu desenvolupament es troba confinat a hàbitats on la llum pot ser absorbida directament per les BCls antena. Això ja ha estat posat de manifest per diversos autors, tant en poblacions de llacs estratificats (Vila i Abella, 1994) com de tapissos microbians (Pierson *et al.*, 1990). Les Clorobiàcies marrons en canvi, posseeixen tant d'un sistema d'absorció eficient (continguts elevats d'Isr) com de la capacitat de modular el contingut d'homòlegs en funció de les condicions lumíniques dominants. Ambdós mecanismes confereixen a aquestes espècies una destacable capacitat de prosperar sota intensitats de llum extremadament baixes.

El procés fotoadaptatiu dels bacteris verds del sofre, lluny d'estar basat en un sol mecanisme, resulta de la fina regulació de tots els elements fotosintètics per tal d'optimitzar l'energia disponible pel creixement. Tot i que dins d'aquest engranatge fisiològic no s'ha de menystenir ni el paper dels carotenoides en l'absorció de la llum ni el de la BCl *a* de la làmina basal i les proteïnes FMO en la transferència d'energia, sembla evident que els homòlegs de les diferents bacterioclorsomes desenvolupen un paper clau en l'adaptació d'aquests bacteris a les condicions lumíniques presents als seus hàbitats.

7. CONCLUSIONS



7. CONCLUSIONS I PROPOSTES

7.1. CONCLUSIONS

1^a. Els bacteris fotosintètics verds del sofre canvien el contingut dels seus homòlegs de bacterioclorofil·la en funció de la intensitat de llum durant el creixement. La composició d'homòlegs d'una espècie determinada no té, per tant, valor taxonòmic però subministra informació valuosa respecte l'estat fisiològic i les condicions a les que l'espècie ha crescut.

2^a. En les espècies de bacteris verds del sofre estudiades, l'adaptació a les baixes intensitats de llum té lloc mitjançant un canvi en la composició de les unitats antena individuals, sense que aquestes augmentin en el seu nombre. Aquesta modificació composicional es dona mitjançant dos mecanismes: i) un de quantitatiu, en el que s'incrementa el contingut general de pigments antena; i ii) un de qualitatiu, més evident en les espècies marrons, en el que s'enriqueix l'antena en aquells homòlegs més alquilats. Ambdós processos no són incompatibles sinó que, en funció de l'espècie implicada, es poden alternar o bé complementar.

3^a. El creixement cel·lular és indispensable per que es donin canvis en la distribució i el contingut d'homòlegs. El fet que aquest re-arranjament només es doni sota intensitats de llum sub-òptimes i crítiques ($< 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), suggereix una fotoregulació de l'equip enzimàtic responsable d'aquestes conversions.

4^a. El paper dels homòlegs secundaris en la fotoadaptació dels bacteris verds del sofre és poc o gens significatiu. Les variacions produïdes en el contingut d'aquests homòlegs minoritaris semblen obeir a desregulacions de les vies biosintètiques dels pigments degut a un estat fisiològic cel·lular deficient. Aquest fenomen es posa de manifest, sobretot, en etapes tardanes del creixement.

5^a. L'enriquiment de l'antena fotosintètica en homòlegs més alquilats no es tradueix en un guany directe en termes d'absorció lumínica, però si pot contribuir a millorar la canalització de l'excitació vers els centres de reacció. Mitjançant això, s'optimitzaria el rendiment del complex antena a intensitats baixes de llum.

6^a. El paper de la BCl α en l'adaptació dels bacteris verds del sofre a les baixes intensitats de llum no sembla destacat. Això és deu bàsicament a la seva exclusivitat com a intermediari en la transferència d'energia i en la limitació espacial que suposa la làmina basal. Els carotenoides, en canvi, resulten indispensables per l'absorció de la llum, sobretot en condicions naturals on aquesta és alterada selectivament.

7^a. Totes les poblacions naturals de bacteris verds del sofre investigades van mostrar un patró d'homòlegs diferent al de les mateixes espècies crescudes en condicions òptimes al laboratori. Aquesta observació, i la similitud d'aquests patrons naturals amb els obtinguts en els experiments fisiològics sota condicions de llum sub-òptimes i crítiques ($0,5$ i $0,1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), evidencia dos fets: primer, que les poblacions naturals

de bacteris verds del sofre creixen en condicions limitants de llum i, segon, que aquestes poblacions re-distribueixen els seus homòlegs per fer front a aquesta limitació lumínica.

8^a. La diversitat de patrons d'homòlegs en poblacions naturals de bacteris verds del sofre respón a dos tipus d'estratègies fotoadaptatives. L'estratègia de les espècies verdes es basa en la possessió de BCl *c* o BCl *d*, dominant les espècies amb aquesta última en aquells ecosistemes on la intensitat de llum és baixa. Les espècies marrons, en canvi, basen la seva fotoadaptació tant en un augment del contingut d'isorenieratè com en la capacitat de modular el contingut d'homòlegs, enriquint l'antena en BCl *e*₃ i BCl *e*₄. El primer mecanisme és clau per absorbir selectivament la llum i el segon per transferir eficientment l'energia absorbida als CR.

9^a. Les poblacions naturals de bacteris verds del sofre mostren variacions del contingut d'homòlegs tant en fondària com al llarg del temps. Les variacions verticals tenen el seu origen en la segregació de les cèl.lules d'acord amb el seu estat fisiològic. Les variacions temporals tenen a veure amb els canvis en el clima lumínic que es donen durant el creixement estacional de la població, la qual adapta progressivament el contingut d'homòlegs fins assolir aquell que és idoni per les condicions lumíniques predominants.

10^a. L'estudi dels patrons pigmentaris de les comunitats bacterianes fotosintètiques amb HPLC possibilita no només l'anàlisi acurat dels diferents pigments sinó que ofereix informació valuosa des del punt de vista ecològic. La comparació de patrons corresponents a poblacions desenvolupades en diferents ecosistemes no explica la dominància d'una espècie o altra, però sí constata la seva presència i, a més, permet valorar tant el seu estat fisiològic com el moment del desenvolupament en el que es troba.

7.2. PROPOSTES PER A FUTURES INVESTIGACIONS

El treball d'investigació presentat no té la intenció de ser un punt i final sinó tot el contrari. Des del nostre punt de vista, els resultats obtinguts han aprofundit en el coneixement que es tenia de la fisiologia pigmentària dels bacteris verds del sofre i de les seves estratègies fotoadaptatives, però alhora han obert nous interrogants. A continuació es presenten algunes propostes per a futures investigacions, que haurien de combinar estudis bioquímics i biofísics amb els purament ecofisiològics, orientats a respondre'ls.

- Realitzar estudis estructurals encaminats a resoldre principalment dues qüestions: primera, conèixer com varia l'ordenació i distribució dels diferents homòlegs de les bacterioclороfil·les en els elements cilíndrics dels clorosomes depenent de la intensitat de llum i, segona, precisar on es troben localitzats els carotenoides dins el complex antena.
- Determinar el paper exacte dels carotenoides en la fotoadaptació pigmentària i quin és el paper que desenvolupen en la millora de la transferència d'energia.

- Avaluar l'efecte de l'enriquiment en homòlegs més alquilats en les taxes de transferència d'energia en els clorosomes d'aquelles cèl·lules sotmeses a condicions limitants de llum. Determinar el paper precís de cadascun dels homòlegs en aquest procés de transferència.
- Analitzar els mecanismes de regulació dels enzims encarregats de metilar els diferents homòlegs de les bacterioclorsofil·les, combinant estudis fisiològics amb d'altres de moleculars (aïllament del gen, mutagènesi dirigida, etc).
- Determinar les variacions estructurals de les BCl *d* que presenten les poblacions naturals de *Pelodictyon clathratiforme* i *Chloronema* spp. i la seva més que probable relació amb la adaptació lumínica d'aquestes poblacions.
- Estudiar i comparar, des del punt de vista pigmentari, les estratègies fotoadaptatives de les poblacions de bacteris verds del sofre en tapisos microbians amb les exhibides per les poblacions naturals en llacs estratificats.

7.3. CONCLUDING REMARKS

1st. Green photosynthetic bacteria exhibit changes in their relative composition of their BChl_f homologs as a response to changes on light regime during growth. Homolog composition is not a constitutive feature of each species and, therefore, do not have any taxonomical value. However, it appears to be a fingerprint of the previous developmental conditions, providing valuable information about the physiological status of the species.

2nd. Adaptation of green sulfur bacteria to low light intensities is produced by means of changes in the composition of individual antenna complexes with no increase in the number of photosynthetic units (antenna plus reaction centers). The modification of chlorosome composition involves two mechanisms: a quantitative one, that is an increase in the specific content of antenna pigments, and a qualitative one, that consists of the enrichment of the photosynthetic antenna in highly alkylated homologs. Both processes are compatible and, depending on the species involved, can be alternated or complemented.

3rd. Cell multiplication is needed to give rise changes in the relative composition of homologs. The re-arrangement of homologs is only apparent at sub-optimal and critical light intensities ($< 1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), suggesting some kind of photoregulation of the corresponding methylating enzymes.

4th. The role of secondary BChl homologs on the adaptation of green sulfur bacteria to low light intensities is negligible. The increase in the content of these pigments is consequence of aberrant pathways in their biosynthesis due to a deficient physiological status during latter stages of growth.

5th. *The enrichment of the photosynthetic antenna in highly alkylated homologs do not produce any benefit in the absorption range, but it seems plausible that it plays an important role on the funneling of excitation among the BChl molecules towards the reaction center. This can be interpreted as a mechanism to optimize the efficiency of the photosynthetic unit under low light intensities.*

6th. *The role of BChl a in the adaptation of green sulfur bacteria to low light intensity it seems neglectable. This observation arise from the fact that BChl a acts only as an intermediary on energy transfer and, moreover, its content is limited by the physical constraints of the chlorosome baseplate. In turn, bacterial carotenoids –particularly isorenieratene– have a decisive role on direct light absorption especially in natural habitats, where available light is quantitatively and qualitatively altered.*

7th. *All the natural populations of green sulfur bacteria analyzed, either green or brown, had a homologs pattern different than the same species grown at the laboratory. This observation, and the fact that natural patterns resembles those obtained experimentally under sub-optimal and critical light conditions (0.5 and $0.1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), indicate that: i) natural populations grow under limiting light intensities and, ii) BChl homologs re-arrangement occurs in natural populations as an adaptation to prevalent light conditions.*

8th. *The diversity of BChl homolog patterns in natural populations results from two different photoadaptive strategies. The strategy of green species is based on the presence of BChl c or BChl d. BChl d-containing species seems to be more adapted to low light climates than BChl c-containing ones. In turn, the fotoadaptation of brown species involve both the increase in isorenieratene content and the enrichment of the antenna in BChl e₃ and BChl e₄. The first mechanism is useful for the selective absorption of light whereas the second may considerably improve the energy transfer to reaction centers.*

9th. *Natural populations of green sulfur bacteria exhibit spatial and temporal changes in their CRH. Vertical changes are attributable to the self-stratification of the population according to the physiological status of the cells. Variations in the CRH of the population along time have their origin on gradual changes in light regime during growth. The adaptation of the population cease when the suitable homologs content for the prevalent light conditions is achieved.*

10th. *The study of pigment patterns from natural photosynthetic bacterial communities by HPLC not only allows an accurate pigment analysis, but also provides valuable eco-physiological information. Although the comparison of homolog patterns from photosynthetic green bacteria populations developed in different habitats cannot explain the prevalence of a given species, it allows us to evaluate its physiological status as well as to confirm its presence.*

7.4. SUGGESTIONS FOR FURTHER WORK

This work provides some clues for understanding the physiological basis of the adaptation of green sulfur bacteria to extremely low light intensities. However, further work is needed in order to resolve several questions that have been raised during the different stages of this study. To answer these questions, biochemical and biophysical studies must be combined with eco-physiological investigations. Here are some suggestions for future research.

- *To perform structural studies focused on: first, the effect of light intensity on the distribution and orientation of different BChl homologs in rod elements inside the chlorosomes and, second, to determine the location of carotenoid pigments inside the antenna complexes.*
- *To determine the exactly role of carotenoids in the photoadaptation of green sulfur bacteria and their potential role on the improvement of energy transfer yield.*
- *To test the effect of highly alkylated homologs on the energy transfer rates in chlorosomes of cells grown under critical light intensities.*
- *To investigate the regulatory mechanisms of the BChl homologs methylating enzymes, combining physiological and molecular biology methods (gene isolation, site-directed mutagenesis, etc.).*
- *To examine the structural variations of the BChl d-like pigment present in natural populations of *Pelodictyon clathratiforme* and *Chloronema* spp., and investigate their possible role on the adaptation of these populations to low light intensities.*
- *To compare the adaptative strategies of green sulfur bacteria populations in microbial mats with those observed by natural populations in stratified lakes.*

8. BIBLIOGRAFIA



8. BIBLIOGRAFIA

- Abaychi, J.K. and J.P. Riley. 1979. The determination of phytoplankton pigments by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem. Acta.* **107**: 1-11.
- Abella, C.A. 1980. *Dinàmica poblacional comparada de bacterias fotosintéticas planctónicas*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Abella, C.A., E. Montesinos and R. Guerrero. 1980. Field studies on the competition between purple and green sulfur bacteria for available light (Lake Sisó, Spain). *Developments on Hydrobiology*, **3**: 173-181.
- Abella, C.A. and L.J. Garcia-Gil. 1988. Diel migration as a mechanism for enrichment of natural populations of branching species of *Pelodictyon*. A: Olson, J.M., J.G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt and H.G. Trüper (eds.). *Green photosynthetic bacteria*, pp. 269-285. Plenum Press.
- Abella C.A. & L.J. Garcia-Gil. 1992. Microbial ecology of planktonic filamentous phototrophic bacteria in holomictic freshwater lakes. *Hydrobiologia*, **243/244**: 79-86.
- Alden, R.G., S.H. Lin and R.E. Blankenship. 1992. Theory of spectroscopy and energy transfer of oligomeric pigments in chlorosome antennas of green photosynthetic bacteria. *J. Lumin.*, **51**: 51-66.
- Bañeras, L. 1993. *Bacteris fototròfics i cicle del fòsfor a l'estanyol del Vilar*. Tesina de llicenciatura. Universitat de Girona.
- Bañeras, L. i R.C. Brunet. 1993. Càrrega de nutrients pels tributaris torrencials a l'estanyol del Vilar (Banyoles) durant tres períodes de precipitació (hivern 1991-92). *SCIENTIA gerundensis*, **19**: 11-21.
- Barica, J. 1979. Why hypertrophic ecosystems? A: Barica, J. and L. Mur (eds.). *Hypertrophic ecosystems, SIL Workshop on Hypertrophic Ecosystems, Developments in Hydrobiology Series*, pp. 9-11. Kluwer Academic Publishers.
- Beer-Romero, P. and H. Gest. 1987. *Heliobacillus mobilis*, a peritrichously flagellated anoxy-phototroph containing bacteriochlorophyll *g*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **41**: 109-114.
- Beer-Romero, P., J.L. Favinger and H. Gest. 1988. Distinctive properties of bacilliform photosynthetic heliobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**: 451-454.
- Betti, J.A., R.E. Blankenship, L.V. Natarajan, L.C. Dickinson and R.C. Fuller. 1982. Antenna organization and evidence for the function of a new antenna pigment species in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **680**: 194-201.
- Bidigare, R.R., M.C. Kennicutt and J.M. Brooks. 1985. Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by high performance liquid chromatography. *Limnol. Oceanogr.*, **30**: 432-435.
- Bielb, H. and N. Pfennig. 1978. Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, **117**: 9-16.
- Blankenship, R.E. 1985. Electron transport in green photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.*, **6**: 317-333.
- Blankenship, R.E., D.C. Brune and B.P. Wittmershaus. 1988. Chlorosome antennas in green photosynthetic sulfur bacteria. A: Stevens, S.E. Jr. and D.A. Bryant, (eds.). *Light-energy transductions in photosynthesis: Higher plants and bacterial models*, pp: 32-47, The American Society of Plant Physiologists.
- Blankenship, R.E., J. Wang, T.P. Causgrove and D.C. Brune. 1990. Efficiency and kinetics of energy transfer in chlorosome antennas from green photosynthetic bacteria. A: Baltscheffsky, M. (ed), *Current Research in Photosynthesis*, Vol II, pp: 17-24. Kluwer Academic Publishers.

- Blankenship, R.E., J.M. Olson and M. Miller. 1995. Antenna complexes from green photosynthetic bacteria. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 399-435. Kluwer Academic Publishers.
- Bobbe, F.W., N. Pfennig, K.L. Swansson and K.M. Smith 1990. Red shift of the absorption maxima in Chlorobiaceae through enzymic methylation of their antenna bacteriochlorophylls. *Biochemistry*, **29**: 4340-4348.
- Borrego, C.M. 1992. *Estudis sobre el creixement de Bacteris Fototròfics del Sofre a l'Estany de Banyoles*. Tesina de Llicenciatura. Universitat de Girona.
- Borrego, C.M., L.J. Garcia-Gil, L. Bañeras and R.C. Brunet. 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of Lake Banyoles. *Vehr. Int. Verein. Limnol.*, **25**: 720-725.
- Borrego, C.M. y L.J. Garcia-Gil. 1994. Caracterización limnológica de la Coromina, una laguna hipereutrófica del sistema lacustre de Banyoles. *Limnética*, **10**(1): 43-51.
- Braumann, T., H. Vasmel, L. H. Grimme and J. Amesz. 1986. Pigment composition of the photosynthetic membrane and reaction center of the green bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **848**: 83-91.
- Brock, T.D., M.L. Brock, T.L. Bott and M.R. Edwards. 1971. Microbial life at 90°C: the sulfur bacteria of Boulder Spring. *J. Bacteriol.*, **107**: 303-314.
- Brockmann, H. 1976. Bacteriochlorophyll *e*: structure and stereochemistry of a new type of chlorophyll from Chlorobiaceae. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **273**:277-285.
- Brockmann, H. jr. and A. Lipinski. 1983. Bacteriochlorophyll *g*. A new bacteriochlorophyll from *Heliobacterium chlorum*. *Arch. Microbiol.*, **136**: 17-19.
- Broch-Due, M., J.G. Ormerod and B. Fjerdingen. 1978. Effect of light intensity on vesicle formation in *Chlorobium*. *Arch. Microbiol.*, **116**: 269-274.
- Broch-Due, M. and J.G. Ormerod. 1978. Isolation of a BChl *c* mutant from *Chlorobium* with BChl *d* by cultivation at low light intensity. *FEMS Microbiology Letters*, **3**: 305-308.
- Bruce, B.D., R.C. Fuller and R.E. Blankenship. 1982. Primary photochemistry in the facultatively aerobic green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6532-6536.
- Brune, D.C., T. Nozawa and R.E. Blankenship. 1987a. Antenna organization in green photosynthetic bacteria. 1. Oligomeric bacteriochlorophyll *c* as a model for the 740 nm absorbing bacteriochlorophyll *c* in *Chloroflexus aurantiacus* chlorosomes. *Biochemistry*, **26**: 8644-8652.
- Brune, D.C., G.H. King, A. Infosino, T. Steiner, M.L.W. Thewalt and R.E. Blankenship. 1987b. Antenna organization in green photosynthetic bacteria. 2. Excitation transfer in detached and membrane-bound chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry*, **26**: 8652-8658.
- Brune, D.C., G.H. King and R.E. Blankenship. 1988. Interactions between bacteriochlorophyll *c* molecules in oligomers and in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. A: Scheer, H. and S. Schneider (eds.), *Photosynthetic light harvesting systems*, De Gruyter & Co., pp: 141-151.
- Brunet, R.C. 1990. *Limnologia comparada en recintes experimentals a l'estanyol del Vilar (Banyoles). Propostes de restauració*. Tesina de llicenciatura, Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Brunet, R.C., L.J. Garcia-Gil y C.A. Abella. 1990. Estudio comparado de parámetros de eutrofización en recintos experimentales de la laguna del Vilar (Banyoles). *SCIENTIA gerundensis*, **16**: 123-132.

- Bunt, J.S. 1964. Analysis of algal pigments by thin-layer chromatography. *Nature*, **203**: 1261-1263.
- Büttner, M., D-L, Xie, H. Nelson, W. Pinther, G. Hauska and N. Nelson. 1992a. Photosynthetic reaction centers genes in green sulfur bacteria and in Photosystem-I are related. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8135-8139.
- Büttner, M., D-L, Xie, H. Nelson, W. Pinther, G. Hauska and N. Nelson. 1992b. The Photosystem-I like reaction center of green sulfur bacteria is a homodimer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**: 154-156.
- Bystrova, M.I., I.N. Malghosheva and A.A. Krasnovsky. 1979. Study of molecular mechanism of self-assembly of aggregated forms of BChl *c*. *Mol. Biol. (English Trans)*, **13**: 582-594.
- Caldwell D.E. and J.M. Tiedje. 1975. The structure of anaerobic bacterial communities in the hypolimnia of several Michigan lakes. *Can. J. Microbiol.*, **21**: 377-385.
- Calvin, M. 1951. The path of carbon in photosynthesis. *Harvey Lectures*, **46**: 218-251.
- Caple, M.B., H. Chow and C.E. Strouse. 1978. Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria. The esterifying alcohols of bacteriochlorophylls *c* from *Chlorobium limicola*. *J. Biol. Chem.*, **253**: 6730-6737.
- Caraco, N. and A.H. Pucoon. 1986. The measurement of bacterial chlorophyll and algal chlorophyll *a* in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, **31**(4): 889-893.
- Caraco, N. 1989. A reply to the coment by Knowlton et al. *Limnol. Oceanogr.*, **34**(7): 1383-1384.
- Causgrove, T.P., D.C. Brune, J. Wang, B.P. Wittmershaus and R.E. Blankenship. 1990. Energy transfer kinetics in whole cells and isolated chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *Photosynth. Res.*, **26**: 39-48.
- Causgrove, T.P., D.C. Brune and R.E. Blankenship. 1992. Förster energy transfer in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *J. Photochem. Photobiol.* **15**: 171-179.
- Chiefari, J., K. Griebenow, N. Griebenow, T.S. Balaban, A.R. Holzwarth and K. Schaffner. 1995. Models for the pigment organization in the chlorosomes of photosynthetic bacteria: diastereoselective control of *in-vitro* bacteriochlorophyll *c*₂ aggregates. *J. Phys. Chem.*, **99**: 1357- 1365.
- Chow, H., M.B. Caple and C.E. Strouse. 1978. Polyethylene powder as a stationary phase for preparative scale reversed-phase HPLC. *J. Chromatogr.*, **151**: 357-362.
- Chung, S., G. Frank, H. Zuber and D. Bryant. 1994. Genes encoding two chlorosome components from the green sulfur bacteria *Chlorobium vibrioforme* strain 8327D and *Chlorobium tepidum*. *Photosynth Res.*, **41**: 261-275.
- Clayton, R.K. 1980. *Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns*. I.U.P.A.B. Biophysics Series, Cambridge University Press.
- Cogdell, R.J., T. Gillbro, P.O. Andersson, R.S.H. Liu and A.E. Asato. 1994. Carotenoids as accessory light-harvesting pigments. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. **66**(5), pp. 1041-1046.
- Cohen, Y., W.E. Krumbein and M. Shilo. 1977. Solar lake (Sinai). 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.*, **22**: 609-620.
- Cohen-Bazire, G. 1963. Some observations on the organization of the photosynthetic apparatus in purple and green bacteria. A: Gest, H., San Pietro, A and Vernon, L.P. (eds.). *Bacterial Photosynthesis*, pp. 89-110. The Antioch Press.
- Cohen-bazire, G., N. Pfennig and R. Kunisawa. 1964. The fine structure of green bacteria. *J. Cell. Biol.*, **22**: 207-255.
- Coveney, M.F. 1982. Elimination of chlorophyll *b* interference in the fluorometric determination of chlorophyll *a* and phaeopigment *a*. *Arch. Microbiol. Beih. Ergebn. Limnol.* , **16**: 77-90.

- Croome, R.L. and P.A. Tyler. 1984. The micro-anatomy and ecology of "Chlorochromatium aggregatum" in two meromictic lakes in Tasmania. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 2717-2723.
- Cruden D.L. and R.Y. Stanier. 1970. The characterization of *Chlorobium* vesicles and membranes isolated from green bacteria. *Arch. Microbiol.*, **72**: 115-134.
- Cruden, D.L., G. Cohen-Bazire and R.Y. Stanier. 1970. *Chlorobium* vesicles: the photosynthetic organelles of green bacteria. *Nature*, **228**: 1345-1347.
- Döring, G., G. Renger, J. Vater and H.J. Witt. 1969. Properties of the photoactive chlorophyll in photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung*, **B24b**: 1139-1143.
- Eichler, B. and N. Pfennig. 1990. Seasonal development of anoxygenic phototrophic bacteria in a holomictic drumlin lake (Schleinsee, F.R.G.). *Arch. Microbiol.*, **119**: 369-392.
- Eskins, K., C.R. Schofield and H.J. Dutton. 1977. High-performance liquid chromatography of plant pigments. *J. Chromatogr.*, **135**: 217-220.
- Evans, C.W., B.B. Buchanan and D.I. Arnon. 1966. A new ferredoxin dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**: 928-934.
- Ewart, A.J. 1897. Bacteria with assimilatory pigments found in the tropics. *Ann. Bot.*, **11**: 486-487.
- Fages, F., N. Griebenow, K. Griebenow, A.R. Holzwarth and K. Schaffner. 1990. Characterization of light-harvesting pigments of *Chloroflexus aurantiacus*. Two new chlorophylls: oley (octadec-9-enyl) and cetyl (hexadecanyl) bacteriochloro-phyllides-c. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*: 2791-2797.
- Falkowski, P.G. and J. Sucher. 1981. Rapid, quantitative separation of chlorophylls and their degradation products by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **213**: 349-351.
- Feick, R.G., M. Fitzpatrick and R.C. Fuller. 1982. Isolation and characterization of cytoplasmic membrane and chlorosomes from the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.*, **150**: 905-915.
- Feick, R.G. and R.C. Fuller. 1984. Topography of the photosynthetic apparatus of *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry*, **23**: 3693-3700.
- Feick, R.G., J.A. Shiozawa and A. Ertlmaier. 1995. Biochemical and spectroscopic properties of the reaction center of the green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 699-708. Kluwer Academic Publishers.
- Feiler, U., D. Albouy, M. Lutz and B. Robert. 1994. Pigment interactions in chlorosomes of various green bacteria. *Photosynth. Res.*, **41**: 175-180.
- Feiler, U. and G. Hauska. 1995. The reaction center from green sulfur bacteria. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 665-685. Kluwer Academic Publishers.
- Fenna, R.E., B.W. Matthews, J.M. Olson and E.K. Shaw. 1974. Structure of a bacteriochlorophyll-protein from the green photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola*. Crystallographic evidence for a trimer. *J. Mol. Biol.*, **84**: 231-240.
- Fenna, R.E. and B.W. Matthews. 1975. Chlorophyll arrangement in a bacteriochlorophyll protein from *Chlorobium limicola*. *Nature (London)*, **258**: 573-588.
- Fernández-Lopez, J.A., L. Almela and J.M. Lopez-Roca. 1991. determination of carotenoids, chlorophylls and phaeophytins by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Photosynthetica*, **25**(1): 81-86.
- Fetisova, Z.G., A.M. Freiberg and K.E. Timpmann. 1988. Long-range molecular order as an efficient strategy for light harvesting in photosynthesis. *Nature*, **334**: 633-634.

- Fiksdahl, A., J.T. Mortensen and S. Liaaen-Jensen. 1978. High-pressure liquid chromatography of carotenoids. *J. Chromatogr.*, **157**: 111-117.
- Findenneg, I. 1935. Limnologische untersuchungen im Kärtner seengebiete. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, **32**: 369-423.
- Fisher, M.R. and A.J. Hoff. 1992. On the long-wavelength component of the light harvesting complex of some photosynthetic bacteria. *Biophys. J.*, **63**: 911-916.
- Foidl, M., J.R. Golecki and J. Oelze. 1994. Bacteriochlorophyll *c* formation and chlorosome development in *Chloroflexus aurantiacus*. *Photosynth. Res.*, **41**: 145-150.
- Förster, T.H. 1948. Intermolecular energy transfer and fluorescence, *Ann. Phys. (Leipzig)*, **2**: 55-75.
- Förster, T.H. 1965. Delocalized excitons and excitation transfer. A: O. Sinanoslu (ed.), *Modern quantum chemistry, Part III*, Academic Press pp: 93-137.
- Fowler, V.J., N. Pfennig, W. Schubert and E. Stackebrandt. 1984. Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria -16S rRNA oligonucleotide cataloguing of 11 species of Chromatiaceae. *Arch. Microbiol.*, **139**: 382-387.
- Frank, H.A. and R.J. Cogdell. 1993. Photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis. A: Young, A. and G. Britton. (eds.). carotenoids in Photosynthesis, pp. 253-326. Chapman and Hall.
- Frank, H.A. and R.L. Christensen. 1995. Singlet energy transfer from carotenoids to bacteriochlorophylls. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 373-384. Kluwer Academic Publishers.
- Fuller, R.C. and T.E. Redlinger. 1985. Light and oxygen regulation of the development of the photosynthetic apparatus in *Chloroflexus aurantiacus*. A: Steinbeck, K.E., S. Bonitz, C.L. Arntzen and L. Bogorad (eds.). *Molecular biology of the photosynthetic apparatus*, pp. 155-162. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Furhmann, S., J. Overmann, N. Pfennig and U. Fisher. 1993. Influence of vitamin B₁₂ and light on the formation of chlorosomes in green and brown-colored *Chlorobium* species. *Arch. Microbiol.*, **160**: 193-198.
- Gantt, E. 1986. Phycobilisomes. A: Staehelin L.A. and C.J. Arntzen (eds.). *Photosynthesis*, Vol. III, pp. 260-268. Springer-Verlag.
- García de Emiliani, M.O. 1973. Fitopláncton de la laguna del Vilà (Gerona, España). *Oecologia Aquatica*, **1**: 107-155.
- Garcia-Gil, L.J., R. Brunet y C.A. Abella. 1987. Incidencia de la inestabilidad de la meromixis en Banyoles IV (lago de Banyoles, Girona) en la dinámica poblacional de bacterias fototróficas del azufre. *Actas del IV Congreso Español de Limnología*, pp: 85-94.
- Garcia-Gil, L.J., R.C. Brunet, E. Montesinos i C.A. Abella. 1988. Estudi comparatiu de l'evolució de la morfometria dels estanyols de la Riera Castellana (Banyoles): estanyol Nou, Sisó i Brollador. *SCIENTIA gerundensis*, **11**: 81-90.
- Garcia-Gil, L.J. 1990. *Bacteris fototrófics i cicle del ferro a l'estany de Banyoles*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Garcia-Gil, L.J. and C.A. Abella. 1992. Population dynamics of phototrophic bacteria in three basins of lake Banyoles (Spain). *Hydrobiologia*, **243/244**: 87-94.
- Garcia-Gil, L.J., C. Borrego, L. Bañeras and C. A. Abella. 1993. Dynamics of phototrophic microbial populations in the chemocline of a meromictic basin of Banyoles lake. *Int. Rev. Gesam. Hydrobiol.*, **78(2)**: 283-294.

- Garcia-Gil, L.J., X. Casamitjana and C. A. Abella. 1996. Comparative study of two meromictic basins of Lake Banyoles (Spain) with sulphur photosynthetic bacteria. *Hydrobiologia*, **319**: 203-211.
- Gasol, J.M. 1988. *Ecologia microbiana a l'estanyol d'en Sisó*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Geacintov, N.E. and J. Breton. 1987. Energy transfer and fluorescence mechanisms in photosynthetic membranes. *CRC Critical Rev Plant Sci.*, **5**: 1-44.
- Gerola, P.D. and J.M. Olson. 1986. A new bacteriochlorophyll *a*-protein complex associated with chlorosomes of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **848**: 69-76.
- Gerola, P.D., P. Højrup, J. Knudsen, P. Roepstorff and J.M. Olson. 1988. The bacteriochlorophyll *c*-binding protein from chlorosomes of *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*. A: Olson, J.M., J.G. Ormerod, J. Ames, E. Stackebrandt and H.G. Trüper (eds.). *Green photosynthetic bacteria*, pp. 43-52. Plenum Press.
- Gest, H. and J.L. Favinger. 1983. *Heliobacterium chlorum*, an anoxygenic brownish-green photosynthetic bacterium containing a "new" form of bacteriochlorophyll. *Arch. Microbiol.*, **136**: 11-16.
- Gibson, J., W. Ludwig, E. Stackebrandt and C.R. Woese. 1985. The phylogeny of the green photosynthetic bacteria: absence of a close relationship between *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *System. Appl. Microbiol.*, **6**: 152-156.
- Gieskes, W.W.C. and G.W. Kraay. 1983. Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigment. *Mar. Biol.*, **75**: 179-185.
- Gieskes, W.W.C. and G.W. Kraay. 1986. Analysis of phytoplankton pigments by HPLC before, during and after mass occurrence of microflagellate *Corymbelus aureus* during the spring bloom in the open northern North Sea in 1983. *Mar Biol.*, **92**: 45-52.
- Gloe, A. and N Pfennig. 1974. Occurrence of phytol and geranylgeraniol in the bacteriochlorophylls of red and green sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, **16**: 93-101.
- Gloe, A., N. Pfennig, H. Brockman and W. Trowitzsch. 1975. A new bacteriochlorophyll from brown-colored Chlorobiaceae. *Arch. Microbiol.*, **102**: 103-109.
- Gloe, A. and N. Risch. 1978. Bacteriochlorophyll *c*₂, a new bacteriochlorophyll from *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.*, **118**: 153-156.
- Golbeck, J.H. 1993. Shared thematic elements in photochemical reaction centers. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 1642-1646.
- Golecki, J.R. and J. Oelze. 1987. Quantitative relationship between bacteriochlorophyll content, cytoplasmic membrane structure and chlorosome size in *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.*, **148**: 236-241.
- Goodwin, T.W. (ed.). 1965. *The chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press.
- Griebenow, K. and A.R. Holzwarth. 1989. Pigment organization and energy transfer in green bacteria. 1. Isolation of native chlorosomes free of bound bacteriochlorophyll *a* from *Chloroflexus aurantiacus* by gel-electrophoresis filtration (GEF). *Biochim. Biophys. Acta.*, **973**: 235-240.
- Griebenow, K. and A.R. Holzwarth. 1990. Biochemical evidence of chromophore-chromophore interactions as the main organizational principle in chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus*. A: Drews, G. (ed.), *Molecular biology of membrane-bound complexes in phototrophic bacteria*, pp: 375-381. Plenum Press.
- Griebenow, K., A.R. Holzwarth, F. van Mourik and R. van Grondelle. 1991. Pigment organization and energy transfer in green bacteria. 2. Circular and linear dichroism spectrum of protein-containing and protein-free chlorosomes isolated from *Chloroflexus aurantiacus* strain OK-70-fl. *Biochim. Biophys. Acta*, **1058**: 194-202.

- Guerrero, R. y C.A. Abella. 1978. Dinámica espacial y temporal de las poblaciones bacterianas fotosintéticas en una laguna sulfurosa anaeróbica. *Oecol. Aquat.*, **3**: 193-205.
- Guerrero, R., E. Montesinos, I. Esteve and C.A. Abella. 1980. Physiological adaptations and growth of purple and green sulfur bacteria in a meromictic lake (Vilar) as compared to a holomictic lake (Siso). *Developments in hydrobiology*, **3**: 161-171.
- Guerrero, R., E. Montesinos, C. Pedrós-Alió, I. Esteve, J. Mas, H. van Gemerden, P.A.G. Hofman and J.F. Bakker. 1985. Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.*, **30**(5): 919-931.
- Guerrero, R., C. Pedrós-Alió, I. Esteve and J. Mas. 1987. Communities of phototrophic bacteria in lakes of the Spanish Mediterranean region. *Acta Academiae Aboensis*, **47** (2): 125-151.
- Hallegraeaf, G.M. 1976. Pigment diversity in freshwater phytoplankton. I. A comparison of spectrophotometric and paper chromatography methods. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, **61**: 149-168.
- Henderson-Sellers, B. and H.R. Markland. 1987. *Decaying lakes. The origin and controls of cultural eutrophication*. Henderson-Sellers, B. and H.R. Markland (eds.). John Wiley & Sons.
- Hildebrandt, P., H. Tamiaki, A.R. Holzwarth and K. Schaffner. 1994. Resonance Raman spectroscopic study of metallochlorin aggregates. Implications for the supramolecular structure of chlorosomal bacteriochlorophyll *c* antennae from green bacteria. *J. Phys. Chem.*, **98**: 2191-2197.
- Hirota, M., T. Moriyama, K. Shimada, M. Miller, J.M. Olson, K. Matsuura. 1992. High degree of organization of bacteriochlorophyll *c* in chlorosome-like aggregates spontaneously assembled in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**: 2071-2074.
- Højrup, P., P.D. Gerola, H.F. Hansen, J.M. Mikelsen, A.E. Shahed, J. Knudsen, P. Roepstorff and J.M. Olson. 1991. The amino acid sequence of a major protein component in the light harvesting complex of the green photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1077**: 220-224.
- Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J.D.H. Strickland. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, **30**: 3-15.
- Holo, H., M. Broch-Due and J.G. Ormerod. 1985. Glycolipids and the structure of chlorosomes in green bacteria. *Arch. Microbiol.*, **143**: 94-99.
- Holo, H. and R. Sirevåg. 1986. Autotrophic growth and CO₂ fixation of *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.*, **145**: 173-180.
- Holo, H. 1989. *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxy-propionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. *Arch. Microbiol.*, **151**: 252-256.
- Holt, A.S. and D.W. Hughes. 1961. Studies of *Chlorobium* chlorophylls. III. *Chlorobium* chlorophyll (650). *J. Am. Chem. Soc.*, **83**: 499-500.
- Holt, A.S., D.W. Hughes, H.J. Kende and J.W. Purdie. 1962. *Chlorobium* chlorophylls. III. *Chlorobium* chlorophyll (660). *J. Am. Chem. Soc.*, **84**: 2835-2836.
- Holt, A.S., J.W. Purdie and J.W.F. Wasley. 1966. Structures of *Chlorobium* chlorophylls (660). *Can. J. Chem.*, **44**: 88-93.
- Holzwarth, A.R., K. Griebenow and K. Schaffner. 1990. A photosynthetic antenna system which contains a protein-free chromophore aggregate. *Z. Naturforsch.*, **45**: 203-296.
- Holzwarth, A.R., K. Griebenow and K. Schaffner. 1992. Chlorosomes, photosynthetic antennae with novel self-organized pigment structures. *J. Photochem. Photobiol. A.*, **65**: 61-71.
- Holzwarth, A.R. and K. Schaffner. 1994. On the structure of bacteriochlorophyll molecular aggregates in the chlorosomes of green bacteria. A molecular modelling study. *Photosynth. Res.*, **41**: 225-233.

- Hughes D.W. and A.S. Holt. 1962. Studies of *Chlorobium* chlorophylls. IV. Preparative liquid-liquid partition chromatography of porphyrins and chlorophyll derivatives and its use to resolve the *Chlorobium phaeophorbides* into six components. *Can. J. Chem.*, **40**: 171-176.
- Humphrey, G.F. and M. Wooton. 1966. Comparison techniques used in the determination of phytoplankton pigments. *Report SCOR-UNESCO*.
- Hurley, J.P. and C.J. Watras. 1991. Identification of bacteriochlorophylls in lakes via reversed-phase HPLC. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 307-315.
- Huster, M. and K.M. Smith. 1990. Biosynthetic studies of substituents homologation in Bacteriochlorophylls *c* and *d*. *Biochemistry*, **29**: 4348-4355.
- Hynninen, P.H. and S. Assandri. 1973. Chlorophylls. II. Allomerization of chlorophylls *a* and *b*. *Acta Chem. Scan.*, **27**: 1478-1486.
- Imhoff, J.F. and H.G. Trüper. 1989. The purple nonsulfur bacteria. A: Staley, J.T., M.P. Bryant, N. Pfennig and J.C. Holt (eds.). *Bergey's manual of Sistematic Bacteriology*, Vol. **3**, pp. 1658-1661. Williams and Wilkins.
- Imhoff, J.F. 1992. Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic bacteria. A: Maan, N.H. and N.G. Carr (eds.). *Photosynthetic prokaryotes. Biotechnology Handbooks*, Vol. **6**, pp: 53-92. Plenum Press.
- Imhoff, J.F. 1995. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. **II**, pp. 1-15. Kluwer Academic Publishers.
- Jacobsen, T.R. 1978. A quantitative method for the separation of chlorophyll *a* and *b* from phytoplankton pigments by high pressure liquid chromatography. *Mar. Sci. Comm.*, **4**: 33-47.
- Jacobsen, T.R. 1982. Comparison of chlorophyll *a* measurements by fluorometric, spectrophotometric and high pressure liquid chromatography methods in aquatic samples. *Arch. Microbiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **16**: 35-45.
- Jacobsen, T.R. and H. Rai. 1990. Comparison of spectrophotometric, fluorometric and high performance liquid chromatography methods for determination of chlorophyll *a* in aquatic samples: Effect of solvents and extraction procedures. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **75**(2): 207-217.
- Jeffrey, S.W. 1961. Paper chromatographic separation of chlorophyll and carotenoids from amrine algae. *Biochem. J.*, **80**: 336-342.
- Jeffrey, S.W. 1968. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta*, **162**: 271-285.
- Jeffrey, S.W. 1974. Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography. *Mar. Biol.*, **26**: 101-110.
- Jeffrey, S.W. and G.F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determininf chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **167**: 191-194.
- Jeffrey, S.W. 1981. An improved thin-layer chromatographic tehnique for marine phytoplankton pigments. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 191-197.
- Jensen, A., O. Aasmundrud and K.E. Eimjhellen. 1964. Chlorophylls from photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **88**: 466-479.
- Jørgensen, B.B., J.G. Kuenen and Y. Cohen. 1979. Microbial transformation of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai). *Limnol. Oceanogr.*, **24**: 799-822.
- Juhler, R.K. and R.P. Cox RP. 1990. High-Performance Liquid Chromatographic determination of chloroplasts pigments with optimized separation of lutein and zeaxanthin. *J Chromatogr.*, **508**: 232-235.

- Kenner, G.W., J. Rimmer, K.M. Smith and J.F. Unsworth. 1976. Studies on the biosynthesis of the *Chlorobium* chlorophylls. *Phil. Trans. R. Soc. (London)*, **273B**: 225-276.
- Kenner, G.W., J. Rimmer, K.M. Smith and J.F. Unsworth. 1978. Structural and biosynthetic studies of the *Chlorobium* chlorophylls-660 (bacteriochlorophylls *c*). Incorporations of methionine and porphobilinogen. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**: 845-852.
- Kirmaier, C., D. Holten, R. Feick and R.E. Blankenship. 1983. Picosecond measurements of the primary photochemical events in reaction centers isolated from the facultative green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Letters*, **158**: 73-78.
- Knowlton, M.F., J.R. Jones and B.D. Perkins. 1989. A comment on "The measurement of bacterial chlorophyll and algal chlorophyll *a* in natural waters" (Caraco and Pucoon). *Limnol. Oceanogr.*, **34**(7): 1381-1382.
- Knox, R.S. 1975. Theory of polarized fluorescence from molecular pairs: Förster transfer at large electronic coupling. *Photochem. Photobiol.*, **57**: 40-43.
- Kondratieva, E.N., N. Pfennig and H.G. Trüper. 1992. The phototrophic prokaryotes. A: Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harden and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*, pp: 312-331, 2^a edición, Springer-Verlag.
- Korthals, H.J. and C.L.M. Steenbergen. 1985. Separation and quantification of pigments from natural phototrophic microbial populations. *FEMS Microbial Ecology*, **31**: 177-185.
- Kraay, G.W., M. Zapata and M.J.W. Veldhuis. 1992. Separation of chlorophylls *c*₁, *c*₂ and *c*₃ of marine phytoplankton by reversed-phase C18-High Performance Liquid Chromatography. *J. Phycol.*, **28**: 708-712.
- Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and E.V. Pakshina. 1966. Effect of the magnesium atom of the pigment molecule on the spectral properties of aggregated forms of chlorophyll analogs. *Doklady Acad. nauk. SSSR (English Trans)*, **167**: 109-112.
- Krasnovsky, A.A. and M.I. Bystrova. 1980. Self-assembly of chlorophyll aggregated structures. *BioSystems*, **12**: 181-194.
- Kusel-Fetzmann, E. 1973. Einige algenbiocönososen im Längsee. *Carinthia II*, **163/83**: 344-348.
- Larsen, H. 1953. *On the microbiology and biochemistry of the photosynthetic green sulfur bacteria*. Ph. D. Thesis.
- Larsen, K.L. 1994. *Antenna systems and reaction centers in green photosynthetic bacteria*. M.S. Dissertation. Universitat d'Odense, Dinamarca.
- Larsen, K.L., R.P. Cox and M. Miller. 1994. Effects of illumination intensity on bacteriochlorophyll *c* homolog distribution in *Chloroflexus aurantiacus* grown under controlled conditions. *Photosynth. Res.*, **41**: 151-156.
- Larsen, K.L., M. Miller and R.P. Cox. 1995. Incorporation of exogenous long-chain alcohols into bacteriochlorophyll *c* homologs by *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.*, **163**: 119-123.
- Lawlor, D.W. 1990. *Photosynthesis. Molecular, physiological and environmental processes*. Longman Scientific and Technical.
- Lehmann, R.P., R.A. Brunisholz and H Zuber. 1994. Structural differences in chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus* grown under different conditions support the BChl *c*-binding function of the 5.7 kDa polypeptide. *FEBS Letters*, **342**: 319-324.
- Liaaen-Jensen, S., E. Heggem and L.M. Jackman. 1964. Bacterial Carotenoids: The carotenoids from photosynthetic green bacteria. *Acta Chemica Scandinavica*, **18**: 1703-1718.
- Liaaen-Jensen, S. 1965. Bacterial carotenoids: XVIII. Aryl carotenes from phaeobium. *Acta. Chem. Scand.*, **19**: 1025-1030.

- Liaaen-Jensen, S. and A.G. Andrewes. 1972. Microbial carotenoids. *Annu. Rev. Microbiol.*, **26**: 227-247.
- Lorenzen, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* **12**: 243-246.
- Lowry, O.H., N.H. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951). Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lutz, M. and G. van Brackel. 1988. Ground-state molecular interactions of bacteriochlorophyll c in chlorosomes of green bacteria and in model systems: A resonance Raman study. A: Olson, J.M., J.G. Ormerod, J. Amesz, E. Stackebrandt and H.G. Trüper (eds.). *Green photosynthetic bacteria*, pp. 23-34. Plenum Press.
- Ma, Y.Z., R.P. Cox, T. Gilbro and M. Miller. 1996. Bacteriochlorophyll organization and energy transfer kinetics in chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus* depend on the light regime during growth. *Photosynth. Res.*, **47**: 157-165.
- Madigan, M.T. and T.D. Brock. 1976. Quantitative estimation of bacteriochlorophyll c in the presence of chlorophyll a in natural environments. *Limnol. Oceanogr.*, **21**: 426-467.
- Madigan, M.T. and J.G. Ormerod. 1995. Taxonomy, physiology and ecology of Heliobacteria. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 17-30. Kluwer Academic Publishers.
- Mantoura, R.F.C. and C.A. Llewellyn. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chem. Acta.*, **151**:297-314.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Ed. Omega.
- Martínez-Taberner, A., G. Moyà, y G. Ramon. 1987. Caracterización limnológica preliminar de la albufera de Alcudia (Mallorca). Composición química del agua y distribución de macrofitos. *Limnetica*, **3**: 55-62.
- Matheron, R. and R. Baulaigue. 1977. Influence de la pénétration de la lumière solaire sur le développement des bactéries phototrophes sulfureuses dans les environnements marins. *Can. J. Microbiol.*, **23**: 267-270.
- Matsuura, K., M. Hirota, T. Moriyama, K. Shimada, Y. Nishimura, I. Yamazaki and M. Mimuro. 1992. Pigment orientation and energy transfer kinetics in chlorosomes of green photosynthetic bacteria A: Murata, N. (ed.). *Research in Photosynthesis*, Vol. I, pp. 113-116. Kluwer Academic Publishers.
- Matsuura, K., M. Hirota, K. Shimada and M. Mimuro. 1993. Spectral forms and orientation of bacteriochlorophylls c and a in chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Photochem. Photobiol.*, **57**: 92-97.
- Matthews, B.W., R.E. Fenna, M.C. Bolognesi, M.F. Schmid and J.M. Olson. 1979. Structure of a bacteriochlorophyll a-protein from the green photosynthetic bacterium *Prostecochloris aestuarii*. *J. Mol. Biol.*, **131**: 259-285.
- Metzner, P. 1922. Über den farbstoff der grünen bakterien. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **40**: 125-129.
- Meyer, T.E. and T.J. Donohue. 1995. Cytochromes, iron-sulfur, and copper proteins mediating electron transfer from the Cyt bc₁ complex to photosynthetic reaction center complexes. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 725-745. Kluwer Academic Publishers.
- Meyns, S., R. Illi and B. Ribi. 1994. Comparison of chlorophyll-a analysis by HPLC and spectrophotometry. Where do the differences come from? *Arch. Microbiol.*, **132**(2): 129-139.
- Michalski, T.J., J.E. Hunt, M.K. Bowman, U. Smith, K. Bardeen, H. Gest, J.R. Norris and J.J. Kantz. 1987. Bacteriopeophytin g: properties and some speculations on a possible primary role for bacteriochlorophylls b and g in the biosynthesis of chlorophylls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2570-2574.

- Miller, M., R.P. Cox and T. Gillbro. 1991. Energy transfer kinetics in chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus*; studies using picosecond absorbance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**: 187-194.
- Miller, M., T. Gillbro and J.M. Olson. 1993a. Aqueous aggregates of bacteriochlorophyll *c* as a model for pigment organization in chlorosomes. *Photochem. Photobiol.*, **57**(1): 98-102.
- Miller, M., D. Simpson and T.E. Redlinger. 1993b. The effect of detergent on the structure and composition of chlorosomes isolated from *Chloroflexus aurantiacus*. *Photosynth. Res.* **35**: 275-283.
- Mimuro, M., T. Nozawa, N. Tamai, K. Shimada, I. Yamakazi, S. Lin, R.S. Knox, B.P. Wittmershaus, D.C. Brune and R.E. Blankenship. 1989. Excitation energy flow in chlorosome antennas of green photosynthetic bacteria. *J. Phys. Chem.*, **93**: 7503-7509.
- Mimuro, M., T. Nozawa, N. Tamai, Y. Nishimura and I. Yamakazi. 1994. Presence and significance of minor antenna components in the energy transfer sequence of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Letters*, **340**: 167-172.
- Molish, H. 1907. Die purpurbakterien nach neuen untersuchungen. *G. Fisher Jena*.
- Montesinos, E. 1981. Crecimiento y actividad de las bacterias fotosintéticas del azufre en relación con gradientes físico-químicos en ecosistemas acuáticos. *Actas del primer Congreso Español de Limnología*, pp: 131-137.
- Montesinos, E. 1982. *Ecofisiología de la Fotosíntesis Bacteriana*. Tesi Doctoral. Universidad Autònoma de Barcelona.
- Montesinos, E., R. Guerrero, C.A. Abella and I. Esteve. 1983. Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1007-1016.
- Montesinos, E. and I. Esteve. 1984. Effect of algal shading on the net growth and production of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Banyoles karstic area. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, **22**(2): 1102-1106.
- Montesinos, E. and H. van Gernerden. 1986. The distribution and metabolism of planktonic phototrophic bacteria. A: Megusar, F. and M. Gantar (eds.), *Proceedings of the IV ISME*, pp: 349-359. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana.
- Moreno-Amich, R. and E. Garcia-Berthou. 1989. A new bathymetric map based on echosounding and morphological characterization of the lake of Banyoles (N-Spain). *Hydrobiologia*, **185**: 83-90.
- Moyà, G., G. Ramon, A. Martínez-Taberner, V. Forteza, C. Picó, C. Ponsell, R. Rosselló and M.A. Soberats. 1987. Limnology of a meromictic coastal lagoon. L'Estany del Cibollar (Majorca, Balearic Islands). *Limnetica*, **3**(2): 255-262.
- Murray, A.P., C.F. Gibbs, A.R. Longmore, and D.J. Flett. 1986. Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. *Mar. Chem.*, **19**: 211-227.
- Nelis, H.J. and P. De Leenheer. 1989. Profiling and quantitation of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 3065-3071.
- Neveux, J. and G. de Billy. 1986. Spectrofluorometric determination of chlorophylls and phaeophytin. Their distribution in the western part of the Indian ocean (July to August 1979). *Deep Sea Res.*, **33**: 1-14.
- Niedermeier, G., H. Scheer and R.G. Feick. 1992. The functional role of protein in the organization of bacteriochlorophyll *c* in chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus*. *Eur. J. Biochem.*, **204**: 685-692.

- Niedermeier, G., J.A. Shiozawa, F. Lottspeich and R.G. Feick. 1994. The primary structure of two chlorosome proteins from *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Letters*, **342**: 61-65.
- Nozawa, T., K. Ohtomo, M. Suzuki, Y. Morishita and M. Madigan. 1991a. Structures of bacteriochlorophyll *c*'s in chlorosomes from a new thermophilic bacterium *Chlorobium tepidum*. *Chem. Lett.*, pp: 1763-1766.
- Nozawa, T., M. Suzuki, K. Ohtomo, Y. Morishita, H. Konami and M.T. Madigan. 1991b. Aggregation structure of bacteriochlorophyll *c* in chlorosomes from *Chlorobium tepidum*. *Chem. Lett.*, pp: 1641-1644.
- Nozawa, T., K. Ohtomo, N. Takeshita, Y. Morishita, M. Osawa and M.T. Madigan. 1992. Substituents effects on the aggregation of bacteriochlorophyll *d* homologues purified from *Chlorobium limicola*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**: 3493-3494.
- Nozawa, T., K. Ohtomo, M. Suzuki, Y. Morishita and M. Madigan. 1993. Structures and organization of bacteriochlorophyll *c*'s in chlorosomes from a new thermophilic bacterium *Chlorobium tepidum*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**: 231-237.
- Nozawa, T., K. Ohtomo, M. Suzuki, H. Nakagawa, Y. Shikama, H. Konami and Z.Y. Wang. 1994. Structures of chlorosomes and aggregated BChl *c* in *Chlorobium tepidum* from solid state high resolution CP/MAS ¹³C NMR. *Photosynth. Res.*, **41**: 211-223.
- Nusch, E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **17**: 14-36.
- Oelze, J. 1985. Analysis of bacteriochlorophylls. *Meth. Microbiol.*, **18**: 257-284.
- Oelze, J and J.R. Golecki. 1995. Membranes and chlorosomes of green bacteria: structure, composition and development. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 259-278. Kluwer Academic Publishers.
- Olson, J.M. and C.A. Romano. 1962. A new chlorophyll from green bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**: 726-728.
- Olson, J.M. 1966. Chlorophyll-protein complexes derived from green photosynthetic bacteria. A: Vernon, L.P. and G.R. Seely (eds.). *The chlorophylls*, pp. 413-425. Academic Press.
- Olson, J.M. 1971. Bacteriochlorophyll-protein of green photosynthetic bacteria. A: San Pietro, A. (ed.). *Methods in Enzymology*, Vol. 23, Part A, pp. 636-639. Academic Press.
- Olson, J.M., B. Ke and K.H. Thompson. 1976. Exciton interaction among chlorophyll molecules in bacteriochlorophyll *a* proteins and bacteriochlorophyll *a* reaction centers complexes from green bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **430**: 524-537. Errata 763.
- Olson, J.M. 1978. Bacteriochlorophyll *a*-proteins from green bacteria. A: Clayton, R.K. and R.S. Sistrom (eds.). *The photosynthetic bacteria*, pp. 161-178. Plenum Press.
- Olson, J.M. 1980a. Chlorophyll organization in green photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **594**: 33-51.
- Olson, J.M. 1980b. Bacteriochlorophyll *a* proteins of two green photosynthetic bacteria. *Meth. Enzymol.*, **69**: 336-344.
- Olson, J.M. and J.P. Pedersen. 1988. Bacteriochlorophyll *c* aggregates in carbon tetrachloride as models for chlorophyll organization in green photosynthetic bacteria. A: Scheer, H. and S. Schneider (eds.), *Photosynthetic Light Harvesting Systems*, pp. 365-373. De Gruyter.
- Olson, J.M. and J.P. Pedersen. 1990. Bacteriochlorophyll *c* monomers, dimers and higher aggregates in dichloromethane, chloroform and carbon tetrachloride. *Photosynth. Res.*, **25**: 25-37.
- Olson, J.M., J.P. Pedersen, T.P. Causgrove, D.C. Brune and R.E. Blankenship. 1990. Bacteriochlorophyll *c* monomers, dimers, and higher aggregates in dichloromethane and carbon tetrachloride. A: Baltscheffsky, M. (ed.), *Current Research in Photosynthesis*, pp. 37-40. Kluwer Academic Publishers.

- Olson, R.A., W.H. Jennings and J.M. Olson. 1969a. Chlorophyll orientation in crystals of bacteriochlorophyll-protein from green photosynthetic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**: 30-41.
- Olson, R.A., W.H. Jennings and C.H. Hanna. 1969b. Paracrystalline aggregates of bacteriochlorophyll protein from photosynthetic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**: 140-147.
- Ormerod J.G. and R. Sirevåg. 1983. Essential aspects of carbon metabolism. A: Ormerod, J.G. (ed.), *The phototrophic bacteria*, pp: 100-119. Blackwell.
- Ormerod, J.G., T. Nesbakken and Y. Torgensen. 1990. Phototrophic bacteria that form heat resistant endospores. A: Baltscheffsky, M. (ed.), *Current Research in Photosynthesis*, Vol IV, pp: 935-938. Kluwer Academic Publishers.
- Ormerod, J.G., T.W. Aukrust and I.J. Johnsen. 1993. Frugal *Chlorobium*: the ultimate phototroph. A: Guerrero, R. and C. Pedrós-Alió (eds.), *Trends in Microbial Ecology*, pp: 59-62. Spanish Society for Microbiology.
- Otsuki, A. and N. Takamura. 1988. Comparison of chlorophyll *a* concentrations measured by fluorometric HPLC and spectrophotometric methods in highly eutrophic small Lake Kasumigaura. *Vehr. int. Ver. Limnol.*, **23**: 944-951.
- Otte, S.C.M., J.C. van der Heiden, N. Pfennig and J. Amesz. 1991. A comparative study of the optical properties of intact cells of photosynthetic green sulfur bacteria containing bacteriochlorophyll *c*, *d* or *e*. *Photosynth. Res.*, **28**: 77-87.
- Otte, S.C.M., E.J. van de Meent, P.A. van Veelen, A. Pundsnes and J. Amesz. 1993. Identification of the major chlorosomal bacteriochlorophylls of the green sulfur bacteria *Chlorobium vibrioforme* and *Chlorobium phaeovibrioides*; their functions in lateral energy transfer. *Photosynth. Res.*, **35**: 159-169.
- Overmann, J. and M.M. Tilzer. 1989. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake. Mittlerer Buchensee, West-Germany. *Aquatic Science*, **51**: 262-278.
- Overmann, J., H. Cypionka and N. Pfennig. 1992. An extremely low-light adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **37**(1): 150-155.
- Pachmayr, F. 1960. *Vorkommen und bestimmung von schwefelverbindungen in mineralwasser*. Ph. D. Thesis. Universitat de Munich.
- Parkin, T.B. and T.D. Brock. 1980a. Photosynthetic bacterial production in lakes: the effects of light intensity. *Limnol. Oceanogr.*, **25**(4): 711-718.
- Parkin, T.B. and T.D. Brock. 1980b. The effects of light quality on the growth of phototrophic bacteria in lakes. *Arch. Microbiol.*, **125**, 19-27.
- Parkin, T.B. and T.D. Brock. 1981. The role of phototrophic bacteria in the sulphur cycle of a meromictic lake. *Limnol. Oceanogr.*, **26**: 880-890.
- Parsons, T.R. and J.D.H. Strickland. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.*, **21**: 155-163.
- Pedrós-Alió, C., E. Montesinos and R. Guerrero. 1983. Factors determining annual changes in bacterial photosynthetic pigments in holomictic lake Sisó, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 999-1006.
- Pedrós-Alió, C., C.A. Abella and R. Guerrero. 1984. Influence of solar radiation, water flux and competition on biomass of phototrophic bacteria in lake Sisó, Spain. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, **22**(2): 1097-1102.
- Pedrós-Alió, C., J.M. Gasol, and R. Guerrero. 1986. Microbial ecology in a sulfurous lake Sisó. A: Megusar, F., M. Gantar (eds.), *Proceedings of the IV ISME*, pag. 638-643, Slovene Society for Microbiology, Ljubljana.

- Pfennig, N. 1965. Anreicherungskulturen für rote und grüne schwefelbakterien. *Zentr. bakteriolog. Parasitenk. Abt. I, Suppl. I*: 179-189.
- Pfennig, N. and K.D. Lippert. 1966. Über das vitamin B₁₂-bedürfnis phototropher schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.*, **55**: 245-256.
- Pfennig, N. and G. Cohen-Bazire. 1967. Some properties of the green bacterium *Pelodictyon clathratiforme*. *Arch. Microbiol.*, **59**: 222-236.
- Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. A: Clayton R.K. and W.R. Sistrom (eds.), *The photosynthetic bacteria*. Plenum. Press, pp: 3-14.
- Pfennig, N. 1980. Synthrophic mixed cultures and symbiotic consortia with phototrophic bacteria: a review. A: Gottschalk, G., N. Pfennig and H. Werner (eds.), *Anaerobes and anaerobic infections*. Gustav-Fischer-Verlag.
- Pfennig, N. 1989. Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria. A: H.G. Schlegel and B. Bowien (eds.), *Autotrophic bacteria*. Springer & Verlag, pp: 97-116.
- Pickett, M.V. M.P. Williamson and D.J. Kelly. 1994. An enzyme and ¹³C-NMR study of carbon metabolism in heliobacteria. *Photosynth. Res.*, **41**: 75-88.
- Pierson B.K. and R.W. Castenholz. 1974a. Phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.*, **100**: 5-24.
- Pierson B.K. and R.W. Castenholz. 1974b. Pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium. *Arch. Microbiol.*, **100**: 283-305.
- Pierson, B.K. and J.P. Thornber. 1983. Isolation and spectral characterization of photochemical reaction centers from the thermophilic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* strain J-10-fl. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 80-84.
- Pierson, B.K. and J.M. Olson. 1989. Evolution of photosynthesis in anoxygenic phototrophic prokaryotes. A: Cohen, Y. and E. Rosenberg, (eds.), *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*, pp: 402-427. American Society of Microbiology.
- Pierson, B.K., V.M. Sands and J.L. Frederick. 1990. Spectral irradiance and distribution of pigments in a highly layered marine microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2327-2340.
- Pierson, B.K. and R.W. Castenholz. 1992a. Taxonomy and physiology of filamentous anoxygenic phototrophs. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 31-47. Kluwer Academic Publishers.
- Pierson, B.K. and R.W. Castenholz. 1992b. The family Chloroflexaceae. A: Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harden and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*, pp: 3754-3774, 2^a edició, Springer-Verlag.
- Purdie, J.W. and A.S. Holt. 1965. Structures of *Chlorobium* chlorophylls (650). *Can. J. Chem.*, **43**: 3347-3353.
- Rai, H. 1973. Methods involving the determination of photosynthetic pigments using spectrophotometry. *Vehr. int. Ver. Limnol.*, **18**: 1864-1875.
- Repeta, D.J., D.J. Simpson, B.B. Jørgensen and H.N. Jannasch. 1989. Evidence for anoxygenic photosynthesis from the distribution of bacteriochlorophyll in the Black Sea. *Nature (London)*, **342**: 68-72.
- Richards, F.A. and T.G. Thompson. 1952. The estimation and characterization of planktonic populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric methods for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, **11**: 156-172.
- Riera, X.G., L.J. García-Gil and C.A. Abella. 1988. Lake Vechten, Schleinsee and Buchensee as examples of central european holomictic lakes containing phototrophic bacteria. *SCENTIA gerundensis*, **14**, pp: 57-69.

- Risch, N. and H. Brockmann Jr. 1976. Absolute configuration of chlorophylls, VIII. The absolute configuration of bacteriochlorophylls *c*, *d* and *e* at C-2'. *Liebigs Ann. Chem.*, pp: 578-583.
- Risch, N., H. Brockmann Jr, and A. Gloe. 1979. Structure of new bacteriochlorophylls from *Chloroflexus aurantiacus*. *Liebigs Ann. Chem.*, pp: 408-418.
- Roget, E. y X. Casamitjana. 1987. Cálculo de los caudales de entrada de agua por las cubetas del lago de Banyoles. *Actas del IV Congreso Español de Limnología*, pp: 39-46.
- Rowan, K.S. 1989. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press.
- Roy, S. 1987. High performance liquid chromatography analyses of chloropigments. *J. Chromatogr.*, **391**: 19-34.
- Scheer, H. 1991. Structure and occurrence of chlorophylls. A: Scheer, H. (ed.), *Chlorophylls*, pp: 4-30. CRC Press.
- Schmidt, K. 1978. Biosynthesis of carotenoids. A: Clayton, R.K. and R.S. Siström (eds.), *The photosynthetic bacteria*, pp. 729-750. Plenum Press.
- Schmidt, K. 1980. A comparative study on the composition of chlorosomes (*Chlorobium* vesicles) and cytoplasmic membranes from *Chloroflexus aurantiacus* strain Ok-70-fl and *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* strain 6230. *Arch. Microbiol.*, **124**: 21-31.
- Schmidt, K., M. Maarzahl and F. Mayer. 1980. Development and pigmentation of chlorosomes in *Chloroflexus aurantiacus* strain Ok-70-fl. *Arch. Microbiol.*, **127**: 87-89.
- Scholz, B. and K. Ballschmitter. 1981. Preparation and reversed-phase high performance liquid chromatography of chlorophylls. *J. Chromatogr.*, **208**: 148-155.
- Schwartz, S.J. and J.H. von Elbe. 1982. High-performance liquid chromatography of plant pigments—a review. *J. Liq. Chromatogr.*, **5** (Suppl. 1): 43-73.
- Senge, M.O. and K.M. Smith. 1995. Biosynthesis and structures of the bacteriochlorophylls. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 137-151. Kluwer Academic Publishers.
- Shimada, K. 1995. Aerobic anoxygenic phototrophs. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 105-122. Kluwer Academic Publishers.
- Shioi, Y. 1991. Analytical chromatography of chlorophylls. A: Scheer, H. (ed.), *The chlorophylls*. CRC Press.
- Simpson D.J. and K.M. Smith. 1988. Structures and transformations of the bacteriochlorophylls *e* and their bacteriopheophorbides. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**: 1753-1758.
- Sirevag, R. 1995. Carbon metabolism in Green Bacteria. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 871-873. Kluwer Academic Publishers.
- Smith, J.H. and A. Benitez. 1955. Chlorophylls. Analysis in plant materials. *Modern methods in plant analysis*. Springer-Verlag.
- Smith, K.M., M.J. Bushell, J. Rimer and J.F. Unsworth. 1980. Bacteriochlorophylls *c* from *Chloropseudomonas ethylica*. Composition and NMR studies of the pheophorbides and derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**: 2437-2448.
- Smith, K.M., G.W. Craig, L.A. Kehres and N. Pfennig. 1983. Reversed-phase HPLC and structural assignments of the bacteriochlorophylls *c*. *J. Chromatogr.*, **281**: 209-223.
- Smith K.M. and D.A. Goff. 1985. Bacteriochlorophylls *d* from *Chlorobium vibrioforme*: chromatographic separations and structural assignments of the methyl bacteriopheophorbides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**: 1099-1113.

- Smith, K.M. and F.W. Bobe. 1987. Light adaptation of bacteriochlorophyll-*d* producing bacteria by enzymic methylation of their antenna pigments. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 276-277.
- Smith, K.M. 1991. The structure and biosynthesis of bacteriochlorophylls. A: Jordan, P.M. (ed.). *Biosynthesis of tetrapyrroles*, pp. 237-255. Elsevier Science Publishers.
- Smith, K.M. 1994. Nomenclature of bacteriochlorophylls *c*, *d* and *e*. *Photosynth. Res.*, **41**: 23-26.
- Sprague, S.G., L.A. Staehelin M.J. DiBartolomeis and R.C. Fuller. 1981. Isolation and development of chlorosomes in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.*, **147**: 1021-1031.
- Sprague, L.A. and A.R. Varga. 1986. Membrane architecture of anoxygenic photosynthetic bacteria. A: Stahelin L.A. and C.J. Arntzen (eds.), *Photosynthesis III, Encyclopedia of plant physiology*, New Series, Vol. **19**, Springer-Verlag, pp: 603-619.
- Sprague, S.G. and R.C. Fuller. 1991. The green phototrophic bacteria and heliobacteria. A: Stolz, J.F. (ed.). *Structure of phototrophic prokaryotes*. CRC Press.
- Stackebrandt, E. and C.R. Woese. 1981. The evolution of prokaryotes. A: Carlile, M.J., J.R. Collins and B.E.B. Moseley (eds.). *Molecular and cellular aspects of microbial evolution*, pp. 1-31. Cambridge University Press.
- Stackebrandt, E. V.J. Fowler, W. Schubert and J.F. Imhoff. 1984. Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria – The genus *Ectothiorhodospira*. *Arch. Microbiol.*, **137**: 366-370.
- Staehelin, L.A., J.R. Golecki, R.C. Fuller and G. Drews. 1978. Visualization of supramolecular architecture of chlorosomes (*Chlorobium* type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch. Microbiol.*, **119**: 269-277.
- Staehelin, L.A., J.R. Golecki and G. Drews. 1980. Supramolecular organization of chlorosomes (*Chlorobium* vesicles) and of their membrane attachment sites in *Chlorobium limicola*. *Biochim. Biophys. Acta*, **589**: 30-45.
- Stanier, R.Y. and J.H.C. Smith. 1960. The chlorophylls of green bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**: 478-484.
- Stanier, R.Y., N. Pfennig and H.G. Trüper. 1981. Introduction to the photosynthetic prokaryotes. A: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Ballows and H.G. Schlegel (eds.). *The proaryotes*, pp. 197-211. Springer-Verlag.
- Steenbergen, C.L.M. and H.J. Korthals. 1982. Distribution of phototrophic microorganisms in the anaerobic and microaerophilic strata of Lake Vechten (The Netherlands). Pigment analysis and their role in primary production. *Limnol. Oceanogr.*, **27**: 883-895.
- Steenbergen, C.L.M. H.J. Korthals and M. van Nes. 1987. Ecological observations of phototrophic sulfur bacteria and the role of these bacteria in the sulfur cycle of monomictic Lake Vechten (The Netherlands). *Acta Acad. Aboensis*, **47**: 97-115.
- Stolz, J.F., R.C. Fuller and T.E. Redlinger. 1990. Pigment-protein diversity in chlorosomes of green phototrophic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **154**: 422-427.
- Sybesma, C. and J.M. Olson. 1963. Transfer of chlorophyll excitation energy in green photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **49**: 248-253.
- Takahashi, M. and S. Ichimura. 1968. Vertical distribution and organic matter production of phototrophic sulfur bacteria in Japanese lakes. *Limnol. Oceanogr.*, **13**: 644-653.
- Takahashi, M. and S. Ichimura. 1970. Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, **15**: 929-944.
- Talling, J.F. and D. Driver. 1961. Some problems in the estimation of chlorophyll *a* in phytoplankton. *10th Pac. Sci. Cong.*, pp: 142-146.

- Thornber, J.P. and J.M. Olson. 1968. The chemical composition of a crystalline bacteriochlorophyll-protein complex isolated from the green bacterium *Chloropseudomonas ethylica*. *Biochemistry*, **7**: 2242-2249.
- Tolstoy, A. and I. Tóth. 1980. Bacteriochlorophyll *d* and its interference on determination of chlorophyll *a*. *Arch. Hydrobiol.*, **89**: 160-170.
- Trees, C.C. and M.C. Kennicutt and J.M. Brooks. 1985. Errors associated with the standard fluorometric determination of chlorophylls and phaeopigments. *Mar. Chem.*, **17**: 1-12.
- Trissl, H.W. 1993. Long-wavelength absorbing antenna pigments and heterogenous absorption bands concentrate excitons and increase absorption cross section. *Photosynth. Res.*, **35**: 247-263.
- Trissl, H.W., B. Hecks and K. Wulf. 1993. Invariable trapping times in photosystem I upon excitation of minor long-wavelength-absorbing pigments. *Photochemistry and Photobiology*, **57**(1): 108-112.
- Tronrud, D.E., M.F. Schmid and B.W. Matthews. 1986. Structure and X-ray amino acid sequence of a bacteriochlorophyll *a* protein from *Prostecochloris aestuarii* refined at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **188**: 443-454.
- Tronrud, D.E. and B.W. Matthews. 1993. Refinement of the structure of a water-soluble antenna complex from green photosynthetic bacteria by incorporation of the chemically determined amino acid sequence. A: Deisenhofer and J. Norris. (eds.), *The photosynthetic reaction center*, Vol. I, pp: 13-21. Academic Press.
- Trüper, H.G. and S. Genovese. 1968. Characterization of photosynthetic sulfur bacteria causing red water in lake Faro (Messina, Sicily). *Limnol. Oceanogr.*, **13**: 225-232.
- Trüper, H.G. and N. Pfennig. 1971. Family of phototrophic green sulfur bacteria: *Chlorobiaceae* Lauterborn; and the taxonomic situation of the consortium-forming species. Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **21**: 8-10.
- Trüper, H.G. and N. Pfennig. 1981. Characterization and identification of the anoxygenic phototrophic bacteria. A: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Ballows and H.G. Schlegel (eds.). *The proaryotes*, pp. 299-312. Springer-Verlag.
- Trüper, H.G. and N. Pfennig 1992. The family Chlorobiaceae. A: Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harden and K.H. Schleifer (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, pp 3583-3592, 2^a Edició, Springer-Verlag.
- Uehara K., Y. Ozaki, K. Okada and J.M. Olson. 1991. FT-IR studies on the aggregation of bacteriochlorophyll *c* from *Chlorobium limicola*. *Chem. Lett.*, pp: 909-912.
- Uehara, K. and J.M. Olson. 1992. Aggregation of bacteriochlorophyll *c* homologs to dimers, tetramers, and polymers in water-saturated carbon tetrachloride. *Photosynth. Res.*, **33**: 251-257.
- Uehara K., M. Mimuro, Y. Ozaki and J.M. Olson. 1994. The formation and characterization of the *in vitro* polymeric aggregates of bacteriochlorophyll *c* homologs from *Chlorobium limicola* in aqueous suspensions in the presence of monogalactosyl diglyceride. *Photosynth. Res.*, **41**: 235-243.
- van de Meent, E.J., M. Kobayashi, C. Erkelens, P.A. van Veelen, S.C.M. Otte, K. Inoue, T. Watanabe and J. Amesz. 1992. The nature of the primary electron acceptor in green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1102**: 371-378.
- van Dorssen, R.J., P.D. Gerola, J.M. Olson and J. Amesz. 1986. Optical structural properties of chlorosomes of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochim. Biophys. Acta*, **848**: 77-82.
- van Gernerden, H. 1967. *On the bacterial sulfur cycle in inland waters*. Ph. D. Thesis, University of Leiden.

- van Gernerden, H., E. Montesinos, J. Mas and R. Guerrero. 1985. Diel cycle of metabolism of phototrophic purple sulfur bacteria in lake Cisó (Spain). *Limnol. Oceanogr.*, **30**(5): 932-943.
- van Gernerden, H. and J. Mas. 1995. Ecology of phototrophic sulfur bacteria. A: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 49-85. Kluwer Academic Publishers.
- van Grondelle, R. 1984. Excitation energy transfer, trapping, and annihilation in photosynthetic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **811**: 147-195.
- van Grondelle, R. and J. Amesz. 1986. Excitation energy transfer in photosynthetic systems. A: Govindjee, J. Amesz and D.C. Fork (eds.). *Light emission by plants and bacteria*, pp. 191-223. Academic Press.
- van Grondelle, R., J.P. Dekker, T. Gillbro and V. Sundstrom. 1994. Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1187**: 1-65.
- van Niel, C.B. 1971. Techniques for the enrichment, isolation and maintenance of the photosynthetic bacteria. A: San Pietro, (ed.), *Methods in Enzymology*, **23**. Academic Press.
- van Noort, P.I., C. Francke, N. Schoumans, S.C.M. Otte, T.J. Aartsma and J. Amesz. 1994. Chlorosomes of green sulfur bacteria: Pigment composition and energy transfer. *Photosynth. Res.*, **41**: 193-203.
- Vasmel, H. and J. Amesz. 1983. Photoreduction of menaquinone in the reaction center of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **724**: 118-122.
- Veldhuis, M.J.W. and G.W. Kraay. 1990. Vertical distribution and pigment composition of a picoplanktonic prochlorophyte in the subtropical Nord Atlantic: a combined study of HPLC analysis and flow cytometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **68**: 121-127.
- Vernon, L.P. 1960. Spectrophotometric determinations of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal. Chem.*, **32**: 1144-1150.
- Vidal, L.M. (1908). Investigaciones de hidrología subterránea en la comarca de Bañolas (Gerona). *Mem. Real. Aca. Cienc. Art. Barcelona*, pp: 339-355.
- Vila, X. and C.A. Abella. 1994. Effects of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynth. Res.*, **41**: 53-65.
- Vila, X. 1996. *Ecologia microbiana de poblacions de bacteris fototròfics en el plàncton lacustre: la distribució de la llum en la selecció entre espècies de diferent composició pigmentària*. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Vollenweider, R.A. (ed.). 1974. *Primary production in aquatic environments*. Blackwells, Oxford.
- Vos, M., A.M. Nuijs, R. van Grondelle, R.J. van Dorssen, P.D. Gerola and J. Amesz. 1987. Excitation transfer in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.*, **891**: 275-285.
- Wagner-Huber, R., R. Brunisholz, G. Frank and H. Zuber. 1988. The bacteriochlorophyll *c*/*e*-binding polypeptides from chlorosomes of green sulfur bacteria. *FEBS Letters*, **239**: 8-12.
- Wagner-Huber, R., R. Brunisholz, G. Frank and H. Zuber. 1990. The primary structure of the presumable BChl *d*-binding polypeptide of *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*. *Z. Naturforsch.*, **45c**: 818-822.
- Wahlund, T.M., C.R. Woese, R.W. Castenholz and M.T. Madigan. 1991. A thermophilic green sulphur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **156**: 81-90.
- Whitney, D. and W. Darley. 1979. A method for the determination of chlorophyll *a* in samples containing degradation products. *Limnol. Oceanogr.*, **24**: 183-186.

- Woese, C.R., E. Stackebrandt, T.J. Macke and G.E. Fox. 1985. The phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *System. Appl. Microbiol.*, **6**: 143-151.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Micobiological Rev.*, **51**(2): 221-271.
- Wright, S.W. and J.D. Shearer. 1984. Rapid extraction and high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J. Chromatogr.*, **294**: 281-295.
- Wright, S.W., S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Lewelyn, T. Bjørnland, D. Repeta and N. Welschmeyer. 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **77**: 183-196.
- Wullink, W., J. Knudsen, J.M. Olson, T.E. Redlinger and E.F.J. van Bruggen. 1991. Localization of polypeptides in isolated chlorosomes from green phototrophic bacteria by immunogold labeling electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1060**: 97-105.
- Yacobi, Y.Z., W. Eckert, H.G. Trüper and T. Berman. 1990. High Performance Liquid Chromatography detection of phototrophic bacterial pigments in aquatic environments. *Microbial Ecology*, **19**: 127-136.
- Zapata, M., A.M. Ayala, J.M. Franco and J.L. Garrido. 1987. Separation of chlorophylls and their degradation products in marine phytoplankton by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **23**: 26-30.
- Zuber, H., R. Brunisholz and W. Sidler. 1987. Structure and function of light harvesting pigment-protein complexes. A: Amesz, J. (ed.). *Photosynthesis*. Elsevier Science Publishers.
- Zuber, H. and R.A. Brunisholz. 1991. Structure and function of antenna polypeptides and chlorophyll-protein complexes: Principles and variability. A: Scheer, H. (ed.), *The Chlorophylls*, pp: 627-703. CRC Press.