

# CRECIMIENTO LOGISTICO DE *CHLOROBIMUM PHAEOVIBRIOIDES* EN CULTIVO DE LABORATORIO: PARAMETROS DE CRECIMIENTO Y ULTRAESTRUCTURA.

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

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

Palabras Clave: Chlorobium cultures, Chlorobium logistic growth, Chlorobium ultrastructure

## ABSTRACT

LOGISTIC GROWTH OF *CHLOROBIMUM PHAEOVIBRIOIDES* IN LABORATORY CULTURES: GROWTH PARAMETERS AND ULTRASTRUCTURE.

Logistic growth of *Chlorobium phaeovibrioides*, isolated from the chemocline of the lagoon of Cullera (Valencia, Spain) has been studied in batch laboratory cultures. In spite of the fact that there are not conspicuous differences in the general pattern of growth between the different cultures studied, a higher crop is apparent in the cultures when acetate is added.

Among the parameters studied, cell numbers and sulfate, bacteriochlorophyll *a* and protein concentrations resulted the most suitable for growth estimations. So, these parameters showed the optimal fitting to the logistic growth equation. Furthermore they showed significative interrelationships between them. An special behaviour has been observed in the initial phase of the culture. Morphological and ultrastructural studies of the organisms in that phase made apparent their peculiar morphs, which were bigger in size and more elongated and spiralized than the normal type.

## INTRODUCCION

Las especies del grupo marrón de la f. *Chlorobiaceae*, a la que pertenece *Chlorobium phaeovibrioides*, han sido señaladas como especies predominantes en la formación de "plates" de bacterias fotosintéticas (Pfennig, 1966, en lagos meromíticos noruegos; Trüper & Genovese, 1968 en el lago Faro de Sicilia; Bergstein *et. al.*, 1979, en el lago monomítico Kinneret, en Israel). En España se han descrito "plates" de dichas bacterias en lagunas litorales como el estany de Cullera, en Valencia, (Montesinos, 1981) y la Massona, en Gerona, (Guerrero & Montesinos, 1983) entre otras.

Su pigmento marrón, el isorenierateno, les permite absorber longitudes de onda entre 480 y 550 nm., lo que les dota de capacidad para vivir a profundidades mayores que las formas verdes de este mismo género (Trüper & Genovese, 1968), o desarrollarse con la luz filtrada por la masa de fitoplacton de las capas superiores. Otras características de las especies de

*Chlorobium* como su resistencia a concentraciones altas de sulfuro, hasta 8 mM (Pfennig, 1975), y su mayor afinidad hacia este compuesto respecto a las *Chromatiaceae* (Van Gemerden & Beeftink, 1981) representan distintos aspectos estratégicos en su competencia con esta familia.

Las dificultades que presentan las especies de *Chlorobium* para su cultivo tienen la causa en su metabolismo poco flexible, cuyas principales características son: 1. Son especies anaerobias estrictas que dependen de compuestos reducidos de azufre como fuente de poder reductor y de la luz como fuente de energía, 2. Su imposibilidad de crecer como quimiotrofos a partir de sustancias orgánicas sencillas (Pfennig, 1978) y 3. Su dependencia del CO<sub>2</sub> como fuente obligada de carbono (Sojka, 1978).

Se presentan aquí resultados sobre el comportamiento de distintos parámetros de crecimiento a lo largo del desarrollo de un cultivo discontinuo de *C. phaeovibrioides*, atendiendo principalmente a su ajuste a la ecuación logística

de crecimiento en orden a entrever el comportamiento general del cultivo.

## MATERIAL Y METODOS

**Microorganismos:** Se ha cultivado una cepa de *Chlorobium phaeovibrioides* aislada a partir de muestras de agua procedentes de la quemoclina del estany de Cullera (Valencia).

**Medio y condiciones del cultivo:** Se ha empleado basicamente el medio descrito por Pfennig (1965), con algunas modificaciones sugeridas por Van Gernerden (comunicación personal) y cuya composición final es: NH<sub>4</sub>Cl 300 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 H<sub>2</sub>O 100 mg/l, MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 200 mg/l, CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 200 mg/l, KCl 100 mg/l, Vit. B<sub>12</sub>, 20 µg/l, solución de elementos traza 10 ml/l, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g/l, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 480 mg/l. El pH se ajustó a 7 y el acetato se añadió opcionalmente, según el tipo de experimento, a una concentración de 3 mM. Este medio se suplenó con NaCl (20 g/l) por tratarse de una cepa salina.

Los cultivos se incubaban en una cámara acondicionada a 26<sup>o</sup> y con una intensidad lumínica de 50 µE/m<sup>2</sup>. s, empleándose luces fluorescentes incandescentes (Sylvania F20 T12 1F).

**Recuento de bacterias y morfología óptica:** Para ambos fines se utilizó la técnica de microscopía de contraste de fases.

**Medida de pigmentos:** Los pigmentos se extraían con acetona al 90%. La cantidad de bacterioclorofila *a* se determinó espectrofotométricamente (Yentsch, 1967; Gloe *et al.*, 1975).

**Análisis químicos:** El sulfuro se midió por el método del azul de metileno (Golterman *et al.*, 1978). El sulfato se determinó mediante nefelometría precipitándolo con cloruro de bario (Rodier, 1976). Las proteínas se midieron por el método de Lowry después de la extracción alcohólica de los pigmentos y del azufre elemental y la posterior solubilización en NaOH 1N del precipitado de proreínas (Herbert *et al.*, 1971).

**Ultraestructura:** Las muestras se fijaron con glutaraldehído 5% durante dos horas y retróxico de osrnio 1% durante una noche en nevera. Una vez tratadas con acetato de uranilo y deshidratadas en sucesivos pasos con etanol, se incluyeron en epoxi resinas (Fluka). Los cortes ultrafinos se tiñieron con citrato de plomo.

**Tratamiento matemático de los resultados:** Los

datos de los parámetros de crecimiento se ajustaron a una ecuación logística, cuya fórmula es  $N = K / (1 + e^{-ct})$  donde  $K$ ,  $r$  y  $c$  son constantes siendo  $K$  la asíntota superior,  $r$  la velocidad específica de crecimiento y  $c$  una constante relacionada con el número inicial de individuos (Williamson, 1972). Tanto los datos como la función fueron transformados logarítmicamente. El ajuste se realizó mediante regresión mínimo cuadrática, empleando el paquete estadístico BMDP(1981) de la Universidad de California, disponible en el centro de cálculo de la Universidad Politécnica de Valencia. Los valores correspondientes a la fase "lag" de la curva de crecimiento no se consideraron para el ajuste

## RESULTADOS

En las figuras 1 (A, B y C) pueden seguirse el desarrollo de los diversos parámetros de crecimiento en un cultivo discontinuo de *C. phaeovibrioides* con CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono. El comportamiento de la densidad óptica (Abs. 830 nm) se ve influido en este caso tanto por las células en suspensión como por la presencia de gránulos de azufre elemental, de tamaño semejante al de las células, producidos a partir de la oxidación del sulfuro. Alcanza su máximo hacia las 15 horas, coincidiendo con el agotamiento del sulfuro, descendiendo a partir de este momento debido a la oxidación del azufre coloidal formado, así como a la agregación de los mismos.

La evolución de la concentración de sulfuro durante las primeras fases del cultivo pone de manifiesto que la oxidación del sulfuro presente comienza inmediatamente, agotándose aun antes de que el número de células inicie un aumento ostensible. Por el contrario, tanto la concentración de bacterioclorofila *a* como la de proreína aumenta desde el inicio del cultivo. Por su parte, la concentración de sulfato no aumenta hasta el agotamiento del sulfuro en el medio, iniciando entonces un aumento exponencial como consecuencia de la activa oxidación del azufre extracelular.

Estas primeras fases del cultivo se caracterizan por la presencia de células grandes y también por la presencia de formas espirales y formas alargadas y retorcidas, como se observa tanto en preparación en fresco como en los cortes ultrafinos, Fig. 2 (A y B),

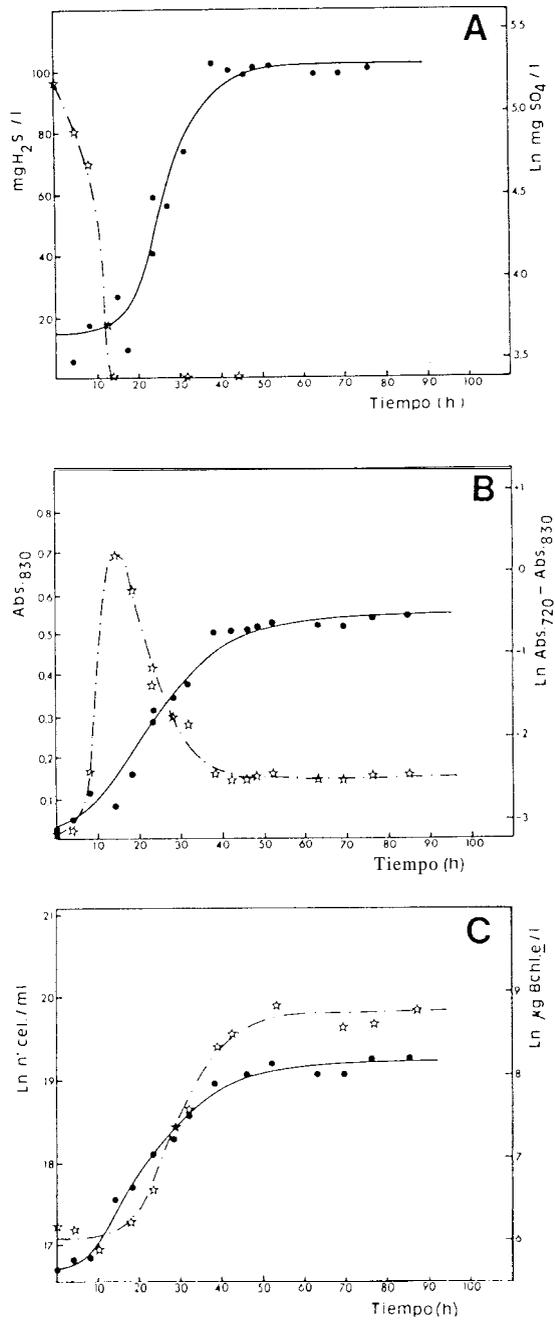


Figura 1 - Evolución de diversos parámetros de crecimiento en el cultivo discontinuo de *C. phaeovibrioides*: A. Evolución de la concentración H<sub>2</sub>S (+) y de la concentración de sulfato (\*); B. Evolución de la Abs. 830 (★) y de (Abs.720 - Abs.830)(●) y C: Evolución del número de células y de la concentración de bacterioclorofila e (●) Evolution of different growth parameters in batch culture of *C. phaeovibrioides*: A. Variation of sulfide (★) and sulfate (\*); B. Variation of Abs.830 (★) and Abs.720 - Abs.830 (●); C Variation of cell numbers (★) and bchlorophyll e concentration (●).

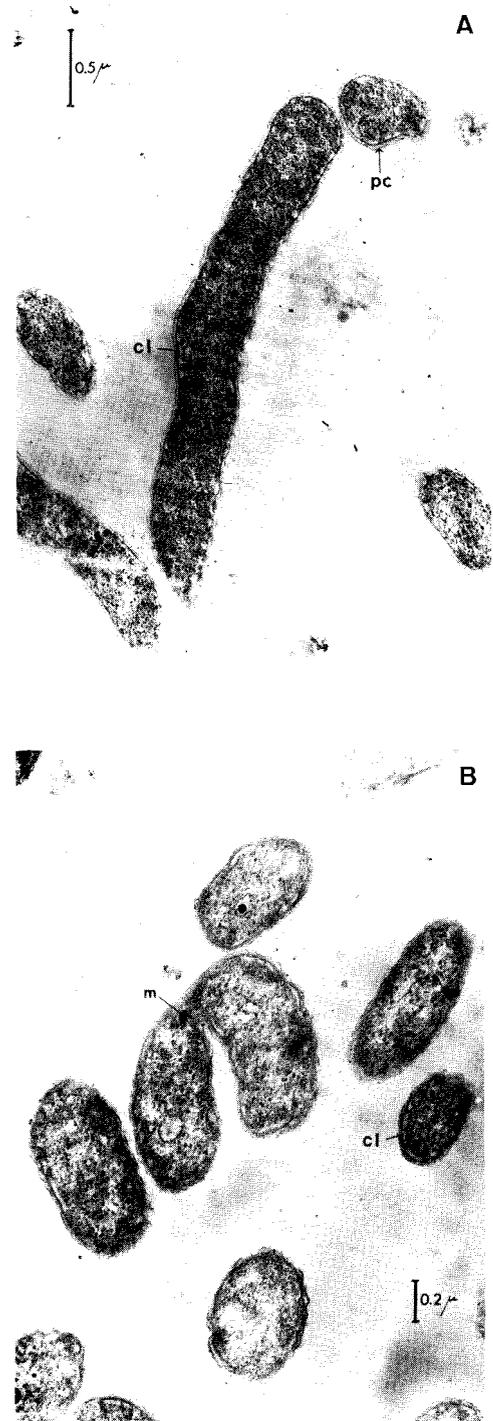


Figura 2 - (A y B) Ultraestructura de células de *C. phaeovibrioides* tomadas en un cultivo de 20 horas. (CL: clorosomas; M: mesosoma; PC: pared celular). Ultrastructure of *C. phaeovibrioides* cells from a 20 hours culture (CL: chlorosomes; M: mesosome and PC: cell wall).

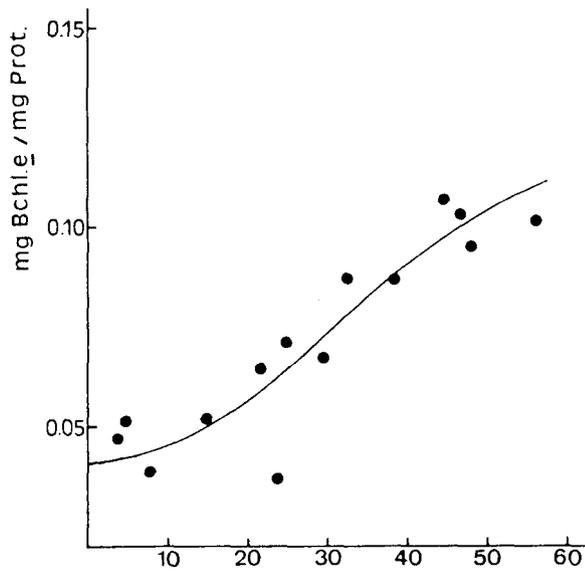


Figura 3.- Evolución de la relación Bchl. e-Proteína a lo largo del crecimiento logístico de *C. phaeoibrioides*.  
Evolution of the ratio between bchlorophyll e and protein contents during the logistic growth of *C. phaeoibrioides*

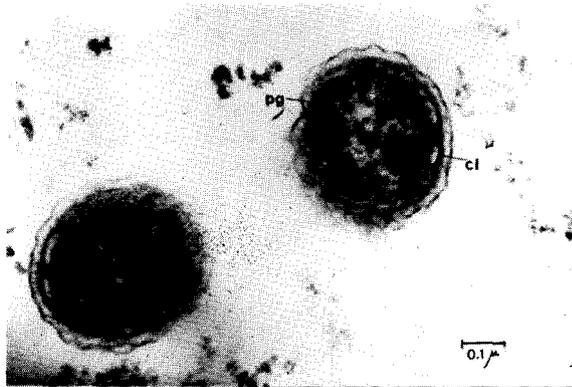


Figura 4.- Ultraestructura de las células de *C. phaeoibrioides* tomadas de la fase estacionaria de un cultivo en medio mineral adicionado con acetato (CL: clorosoma; PG: poliglucosa)  
Ultrastructure of *C. phaeoibrioides* cells from stationary phase of a culture growing in a mineral medium with added acetate (CL: chlorosomes; PG: polyglucose)

Tabla 1 - Ajuste a la ecuación logística de los distintos parámetros de crecimiento.. The logistic equations fitted to the main growth parameters.

	$\mu_{max}$ . (h <sup>-1</sup> )	Valor máx		
Nº. Cél.	0.15	4 x 10 <sup>8</sup> cél/ml	F(2,11)=219'4	Sig.
Bchl. e	0.10	35 $\mu$ g/ml	F(2,15)=400'0	Sig.
SULFATO	0.16	197 mg/l	F(2,10)=91'4	Sig.
Abs. 720-Abs. 810	0.10	0.584	F(2,15)=139'6	Sig.
PROTEINA	0.07	46.3 mg/l	F(2,10)=24'6	Sig.

Tabla 2 - Valores de (Abs 720-Abs. 830) en diversos cultivos de *C. phaeoibrioides* a las 20 horas de cultivo  
(Abs. 720-Abs. 830) values in different cultures of *C. phaeoibrioides* at 20 hours of growth.

	Abs.720 - Abs.830	$\mu$ g Bchl. e / l	Nº. Cel./ml
SIN ACETATO			
2 mM H <sub>2</sub> S	0.232	1042	1.2 x 10 <sup>8</sup>
4 mM H <sub>2</sub> S	0.010	729	6.2 x 10 <sup>7</sup>
CON ACETATO			
2 mM H <sub>2</sub> S	0.290	1566	1.0 x 10 <sup>8</sup>
4 mM H <sub>2</sub> S	0.025	1485	7.2 x 10 <sup>7</sup>

Respecto a la relación bchl. e /proteína cabe decir que ésta evoluciona hacia valores mayores al aumentar la densidad del cultivo (Fig.3).

El ajuste a la ecuación logística resultó significativo para los siguientes parámetros ensayados: nº. de células, concentraciones de bchl.e, proteína y sulfato, y el valor Abs.<sub>720</sub>-Abs.<sub>830</sub>, situándose en 720 nm el pico de la bchl.e y en 830 nm una medida de la turbidez. El ajuste permite además estimar los valores de la  $\mu_{max}$  y de la cosecha máxima (Tabla 1). Aún siendo válido el valor Abs.<sub>720</sub>-Abs.<sub>830</sub> para el seguimiento de un mismo cultivo, sus valores en cultivos con distintas concentraciones iniciales de sulfuro o acetato no son fácilmente equiparables, debido principalmente a la interferencia provocada por el azufre en suspensión (Tabla 2).

Observaciones semejantes se siguen en cultivos crecidos en presencia de acetato como fuente adicional de carbono. En esta ocasión los cultivos presentaron un mayor rendimiento (9.5 x 10<sup>8</sup> cél/ml y 4.8  $\mu$ g Bchl. e/ml). Los cortes ultrafinos muestran células con numerosas inclusiones opacas al paso de los electrones de líneas 20 nm. de diámetro, que presentan el aspecto característico de los gránulos de poliglucosa (Fig. 4).

## DISCUSION

En el transcurso del cultivo discontinuo de *C. phaeovibrioides* se asiste a un continuo cambio de condiciones físico-químicas como son la calidad y concentración de nutrientes -especialmente la fuente de poder reductor y la disponibilidad de luz del cultivo.

Así en una primera etapa observamos una rápida oxidación del sulfuro a azufre elemental, que enturbia el cultivo con sus micelas coloidales, mientras que en una segunda etapa se utiliza este azufre extracelular como fuente de electrones. Por otra parte la disponibilidad de luz disminuye como consecuencia del aumento de la densidad del cultivo.

Estas condiciones cambiantes dan lugar por fin a un cultivo desequilibrado en el que parámetros como la relación chl. *a*/proteína varían en el transcurso del cultivo, o en el que la misma morfología celular aparece afectada de distinta forma a lo largo del mismo, presentando grandes formas espirales o alargadas en las primeras fases para resolverse paulatinamente en la misma fase exponencial en células más pequeñas e individuales.

De especial interes se ha revelado la utilización del valor  $Abs_{720}$ - $Abs_{830}$  como parámetro de crecimiento. Si bien los dos valores  $Abs_{720}$  y  $Abs_{830}$  se comportan por separado ajenos a la ecuación logística de crecimiento, debido a la interferencia provocada por los gránulos de azufre extracelular, su diferencia se ajusta significativamente a dicha ecuación. No obstante manifestamos serias reservas para su utilización a la hora de equiparar valores procedentes de cultivos con distintas concentraciones de sulfuro o acetato iniciales, y en general cualquier tipo de modificación en las condiciones de cultivo.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a M. Serra Galindo del Dpto. de Ecología de esta Facultad su contribución al tratamiento matemático de los resultados.

## BIBLIOGRAFIA

- Bergstein, T.; Henis, Y. & Cavari, B.Z. 1979 Investigations on the photosynthetic bacterium *Chlorobium phaeobacteroides* causing seasonal blooms in Lake Kinneret. *Can. J. Microbiol.* 25:999-1007.
- Gloe, A.; Pfennig, N.; Brockmann, H. & Trowitzsch, W. 1975 A new bacteriochlorophyll from brown-colored *Chlorobiaceae*. *Arch. Microbiol.* 102:103-109.
- Golterman, H.L.; Clymo, R.S. & Ohnstad, M.A.M. 1978 Methods for physical & chemical analysis of fresh waters Blackwell Scientific Publications.
- Guerrero, R. & Montesinos, E. 1983 Comunidades bacterianas fotosintéticas en lagos y lagunas de la Región mediterranea española. Comunicación al II Congreso de Limnología (Murcia).
- Herbert, D.; Phipps, P. J. & Strange, R. E. 1971. Chemical analysis of the microbial cell Methods in Microbiology. Vol. 5B: 209-344 London. Academic Press.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randall, S. J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Montesinos, E. 1981. Crecimiento y actividad de las bacterias fotosintéticas del azufre en relación con gradientes físico-químicos en ecosistemas acuáticos Comunicación al I Congreso de Hidrobiología. Barcelona
- Pfennig, N. 1965. Anrei cherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hzigiene, Abt. 1 Supp 1*: 179-189
- Pfennig, N. 1966. On the biology of two brown colored *Chlorobium* species. Ninth Intern. Congr. Microbiol., Moscow
- Pfennig, N. 1975. The phototrophic bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant and Soil* 43: 1-16.
- Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria. *The Photosynthetic Bacteria*. (Clayton, R.K. & Sistrom, W. R. eds.) Chapter 1. Plenum Press
- Rodier, J. 1976. *L'analyse de l'eau*. Dunod ed Paris.
- Sojka, G. A. 1978. Metabolism of nonaromatic organic compounds. *The Photosynthetic Bacteria*. (Clayton, R. K. & Sistrom, W. R. eds.) Chapter 37. Plenum Press.
- Trüper, H.G. & Genovese, S. 1968. Characterization of photosynthetic sulfur bacterium causing red water in Lake Faro (Messina, Sicily) *Limnol. Oceanogr.* 13: 225-232.
- Van Gemerden, H. & Beeftink, H.H. 1981. Coexistence of *Chlorobium* and *Chromatium* in a sulfide-limited continuous culture. *Arch. Microbiol.* 129: 32-34
- Williamson, M. 1972. *The analysis of biological populations* E Arnold Ltd. Ed. London.
- Yentsch, C. 1967. The measurement of chloroplactic pigments, thirty years of progress?. En H. L. Golterman & R.S. Clymo (eds ), *Chemical environment in the aquatic habitat* N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij, Amsterdam