PRODUCCIÓN PRIMARIA POR FOTOTROFÍA Y POR QUIMIOLITOTROFÍA EN LA LAGUNA DE CISÓ

Josefina García Cantizano, J. Ma. Gasol y Carlos Pedrós-Alíó

Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de
Barcelona, Bellaterra, BARCELONA.

Palabras clave: Producción primaria, bacterioplancton, quimiolito-
autotrofia.

SUMMARY

PRIMARY PRODUCTION THROUGH PHOTOTROPHY AND CHEMOLITHOTROPHY IN LAKE CISÓ

Key words: Primary production, bacterioplankton, chemolitho-
autotrophy.

The contribution of different microbial processes to primary production was measured in Lake Cisó, a small lake which becomes completely anaerobic during the winter. Large populations of phototrophic bacteria dominated the lake during the winter. During summer stratification, phytoplankton, phototrophic bacterioplankton, and chemolithoautotrophic bacterioplankton contributed an estimated 65, 25 and 10%, respectively, of primary production. During winter holomixis, phototrophic and chemotrophic bacterioplankton contributed 50% each.

INTRODUCCIÓN

La producción primaria consiste en la incorporación de carbono inorgánico, en forma de CO_2 y su conversión en materia orgánica. Normalmente, la mayor parte de la fijación en lagos es llevada a cabo por algas planctónicas mediante el proceso conocido como fotosíntesis oxigénica. Como consecuencia, suele medirse la producción primaria en lagos mediante la incorporación de CO_2 en botellas claras una vez descontada la incorporación en la oscuridad (REYNOLDS 1984). Sin embargo, existen diversos mecanismos metabólicos por los que el carbono inorgánico puede entrar a formar parte de la biomasa de un ecosistema y que, o bien quedan excluidos de este método de medida, o bien quedan asimilados a la fotosíntesis oxigénica sin serlo (Tabla 1). En primer lugar, la fotosíntesis oxigénica llevada a cabo por plantas, algas y cianobacterias es un proceso muy ampliamente extendido en el que se utiliza agua como donadora de electrones y se genera oxígeno. En segundo lugar, existe la

fotosíntesis anoxigénica, realizada por algunas cianobacterias y por las bacterias fototróficas del azufre y no de azufre. Estos organismos utilizan sulfhídrico, hidrógeno, o algún otro compuesto reducido como donadores de electrones y generan sulfato, agua o algún otro compuesto oxidado, pero siempre distinto del oxígeno. Este proceso ocurre solamente en ecosistemas anaeróbicos (BIEBL Y PFENNIG 1979). En tercer lugar, la mayor parte de los organismos pueden fijar una pequeña cantidad de CO_2 en forma de materia orgánica mediante enzimas tales como la fosfoenol piruvato carboxilasa. Por este procedimiento, se calcula que las bacterias heterotróficas pueden obtener el 6% de sus requerimientos de carbono (ROMANENKO 1973). Este proceso suele ser de muy escasa importancia cuantitativa al compararlo con los otros. Finalmente, existen algunos grupos especializados de bacterias que pueden crecer mediante un metabolismo quimiolitotrófico, en el que fijan CO_2 como fuente exclusiva de carbono y utilizan algún compuesto inorgánico reducido como fuente de electrones y energía. Por ejemplo, las bacterias del género *Thiobacillus* oxidan sulfhídrico a sulfato, transfiriendo los electrones al oxígeno y fijando CO_2 . La necesidad de disponer simultáneamente de compuestos reducidos y de oxígeno hace que estos microorganismos solo puedan ser abundantes en las interfases entre ecosistemas aeróbicos y anaeróbicos (GORLENKO *et al.* 1983).

Tabla 1. Substratos y productos de los distintos procesos de fijación de CO_2 y organismos que los pueden llevar a cabo. Los organismos que pueden hallarse en el Lago Cisó se han marcado en cursiva.

Table 1. Substrates and products of the different CO_2 fixation processes and organisms carrying them out. Organisms that can be found in Lake Cisó are shown in italics.

Proceso	Substratos			Productos	Organismos
	Fuente energía	Donador electrones	Aceptor electrones		
Fotosíntesis oxigénica	luz	H_2O	CO_2	O_2 , MO ^a	Plantas, <i>algas</i> y cianobacterias
anoxigénica	luz	H_2S , H_2	CO_2	SO_4 , H_2O , NO	Cianobacterias <i>Bacterias verdes</i> <i>Bacterias rojas</i>
Fijación por heterótrofos química		NO	O_2 , CO_2	CO_2 , H_2O , NO	<i>La mayoría</i>
Quimiolitotrofia	química	H_2S , NH_4 , NO_2 , Fe^{2+}	O_2 , CO_2	H_2O , NO	<i>Bac. del azufre</i> <i>Bac. nitrificantes</i> <i>Bac. del hierro</i>

^a NO: materia orgánica. *Organic matter*

En el presente trabajo se midieron estos distintos componentes de la producción primaria en la laguna de Cisó, donde la presencia de zonas anaeróbicas y aeróbicas hacía prever la importancia de los procesos exclusivamente bacterianos antes descritos. Para diferenciar la fotosíntesis oxigénica de la anoxigénica se utilizó el inhibidor del fotosistema dos (exclusivo de la oxigénica) DCMU y, para diferenciar la quimiolitotrofia, se midió la incorporación en tubos tapados (en la oscuridad).

MATERIAL Y MÉTODOS

Todas las muestras se tomaron en la laguna de Cisó (Banyoles, Gerona) con botellas de Ruttner y se recogieron en botellas Pyrex tapadas con papel de aluminio, que se guardaron en neveras con hielo hasta su procesamiento. En el lago se midieron temperatura, conductividad, alcalinidad, pH, penetración de la luz, concentraciones de amonio, nitrato, nitrito, sulfhídrico y oxígeno según métodos ya descritos (GUERRERO *et al.* 1985, PEDRÓS-ALIÓ *et al.* 1987a).

Los pigmentos se determinaron mediante espectros de absorción de extractos en acetona al 90% según las fórmulas de TAKAHASHI & ICHIMURA (1970) para la bacterioclorofila *a* y las de CARACO (1986) para las bacterioclorofilas *a₁* y *a₂* y para la clorofila *a*. También se realizaron espectros de absorción *in vivo* suspendiendo las muestras naturales en una disolución concentrada de sacarosa antes de realizar el espectro.

La producción primaria se midió mediante la incorporación de bicarbonato marcado con carbono 14 ($100 \mu\text{Ci mL}^{-1}$, Amersham). Las incubaciones se realizaron en tubos de 22 mL de capacidad y con tapón de rosca, a los que se añadieron 0.05 mL de la disolución de bicarbonato. Los tubos se incubaron bien en el lago, suspendidos de una plataforma superficial descrita con anterioridad (GUERRERO *et al.* 1985), o bien en el laboratorio, en una cámara a 27 °C con iluminación fluorescente entre 60 y 100 $\mu\text{Einst. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para cada condición experimental se incubaron dos réplicas, dos tubos tapados con papel de aluminio, dos tubos con DCMU 10^{-5} M , y un tubo con formol (4% concentración final). Las incubaciones en el lago duraban cuatro horas y en el laboratorio entre 1 y 3. Para detener la incubación se pusieron los tubos en hielo, en la oscuridad, y se filtraron inmediatamente por filtros Whatman GF/C, se dejaron secar los filtros, se les sometió a vapores de HCl concentrado y se contó la radiactividad en viales de centelleo con un coctel de base tolueno, en un contador de centelleo LKB 1211 Rackbeta. En experimentos de control se pudo comprobar que los filtros usados daban mejores resultados que otros de tamaño de poro inferior, pero de distinto material, como los Sartorius de 0.45 μm de diámetro de poro. También se llevaron a cabo controles para determinar la posible inhibición que el etanol en el que se disuelve el DCMU pudiera tener sobre la fijación de carbono radiactivo, comprobándose que no era significativa. Así mismo, se comprobó que no era necesaria una preincubación con DCMU, un inhibidor del fotosistema II, para su total efectividad, por lo que se pudo eliminar este paso.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se ha recogido la distribución vertical de los parámetros relevantes durante un típico día de holomixis y otro de estratificación. Durante la holomixis, caracterizada por la homogeneidad en el perfil vertical de temperatura, la intensidad de la luz disminuía rápidamente con la profundidad, desapareciendo totalmente un metro por debajo de la superficie. Esta escasa penetración de la luz se debía a la presencia de grandes cantidades de bacterias fototróficas del azufre en toda la columna de agua. Los perfiles verticales de pigmentos muestran la total ausencia de organismos con Chl *a* (fitoplancton) y la gran abundancia de bacterioclorofilas, tanto la Bchl *a* correspondiente a bacterias rojas del azufre, como la combinación de Bchl *c*, *d*, y *e*, correspondientes a bacterias verdes del azufre. La presencia de estas bacterias, anaeróbicas estrictas, por todo el lago era posible gracias a la distribución vertical del sulfhídrico, que presentaba una concentración de 0,6 mM por todo el lago. Solamente en los 50 cm superiores disminuía esta concentración debido a la interacción con el oxígeno procedente de la atmósfera y a las actividades de los microorganismos oxidadores del azufre. La distribución de los compuestos de nitrógeno mostraba, así mismo, que los compuestos oxidados de nitrógeno (nitrato y nitrito) se hallaban solamente en los cm superficiales, mientras que el amonio alcanzaba concentraciones de 0,25 mM por el resto de la columna de agua.

La situación durante la época de estratificación era completamente distinta. El perfil de temperatura mostraba una estratificación clara con una termoclina entre 1 y 3 m de profundidad. La penetración de la luz era mayor que durante el invierno alcanzando hasta el metalimnion, donde se acumulaban organismos portadores de Chl *a*, sobre todo Cryptomonas phaseolus, que en esta época del año podía alcanzar concentraciones de hasta 10^5 células mL^{-1} . La distribución de las bacterioclorofilas muestra como las bacterias fototróficas se distribuían formando un máximo de abundancia por debajo del máximo de Chl *a*, pero estaban presentes en todo el hipolimnion. La distribución de los compuestos de nitrógeno y el sulfhídrico era consecuencia de un epilimnion aeróbico y un hipolimnion anaeróbico.

Los perfiles de luz, de nitrito, amonio y sulfhídrico muestran la distribución de las fuentes de energía y electrones potenciales para los distintos procesos mediante los que los microorganismos pueden contribuir a la producción primaria (véase la Tabla 1). Como puede apreciarse en la Fig. 1, los organismos fototróficos oxigénicos solo podían ser activos en el epi- y metalimnion durante el verano y en los cm superficiales durante el invierno. En cambio, los fototróficos anoxigénicos podían ocupar todo el lago durante el invierno y el meta- y hipolimnion en verano. La distribución de las clorofilas muestra que, efectivamente, ésta era la distribución de los microorganismos fototróficos. Por el contrario, no existe forma sencilla de detectar las bacterias quimiolitotóxicas, por no tener características morfológicas identificables. Por lo tanto, solamente se puede sugerir que las bacterias nitrificantes estarían presentes en el epilimnion durante el verano, gracias a la disponibilidad simultánea de nitrito, amonio y oxígeno, mientras que las bacterias del azufre estarían en la superficie durante el invierno y en el metalimnion durante el verano, es decir en aquellos lugares en los que coexistían sulfhídrico y oxígeno.

Figura 1. Distribución vertical de diversos parámetros en el lago Cisó, durante un día de holomixis (arriba, 11 diciembre 1986) y durante un día de estratificación (abajo, 15 julio 1986). Los paneles de la izquierda muestran los perfiles de temperatura (●) y porcentaje de luz superficial a cada profundidad (○). Los paneles centrales muestran las concentraciones de sulfhídrico (mM, ●), amonio (mM, ■), nitrito (μM , ▲), nitrato (μM , □) y oxígeno (mg L^{-1} , ○). Los paneles de la derecha muestran la distribución vertical de los pigmentos fotosintéticos clorofila a (○), bacterioclhorofila a (●) y bacterioclhorofilas c, d, e (△), todas en $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figure 1. Vertical distribution of several parameter in Lake Cisó, during a day of holomixis (upper part, December 11, 1986) and a day of stratification (lower part, July 11, 1986). Left hand panels show profiles of temperature (●), and percent of surface light (○). Central panels show concentrations of sulfide (mM, ●), ammonia (mM, ■), nitrite (μM , ▲), nitrate (μM , □), and oxygen (mg L^{-1} , ○). Right hand panels present distribution of photosynthetic pigments chlorophyll a, bacterioclhorophyll a, and bacterioclhorophylls c, d, and e in $\mu\text{g L}^{-1}$.

En la Fig. 2 se han representado dos experimentos de campo que ilustran la repartición de la producción primaria entre los distintos grupos de microorganismos, en una situación de estratificación y otra de holomixis. Durante la estratificación se sucedían tres picos de fijación de CO_2 : el más superficial correspondiente a fitoplancton aeróbico, el intermedio debido a fijación oscura, es decir por bacterias quimiolitotróficas y el inferior, en la parte más profunda del metalimnion, debido a bacterias fototróficas. En esta ocasión no existía el máximo metalimnético de *Cryptomonas phaseolus*, de lo contrario se habría detectado un segundo pico de fotosíntesis oxigénica en la parte superior del metalimnion.

Figura 2. Distribución vertical de la fijación de CO_2 por distintos procesos microbianos durante un día de estratificación (izquierda, 12 julio 1983) y otro de holomixis (derecha, 11 diciembre 1986). Los paneles superiores muestran la fijación de carbono, en las unidades indicadas, por algas (○), bacterias quimiolitotróficas (●) y por bacterias fototróficas (Δ). Los paneles inferiores muestran los mismos datos expresados en forma de porcentajes respecto al total para algas (histogramas blancos), bacterias quimiolitotróficas (histogramas punteados) y bacterias fototróficas (histogramas negros).

Figure 2. Vertical distribution of carbon fixation through different microbial processes for a stratification day (left, July 12, 1983) and a holomixis day (right, December 11, 1986). Upper panels show carbon fixation by algae (○), chemolithoautotrophic bacteria (●), and phototrophic bacteria (Δ). Lower panels show the same data as percent of total fixation, for algae (white bars), chemolithotrophic bacteria (stippled bars), and phototrophic bacteria (black bars).

La situación durante la holomixis era completamente distinta. Al hallarse la interfase entre las condiciones aeróbicas y anaeróbicas en la superficie, el máximo de fijación por bacterias quimiolitotróficas era superficial. No existía fijación por fotosíntesis oxigénica y la anoxigénica también presentaba un máximo superficial (Fig. 2).

Así pues, la fijación por el fitoplancton mediante fotosíntesis oxigénica no solamente no era el único proceso fijador de CO_2 , sino que en determinados periodos ni siquiera funcionaba. Incluso en la zona de lago con

Tabla 2. Porcentajes de la fijación total de CO_2 que llevaron a cabo algas, bacterias fototróficas y litotróficas en la profundidad de mayor abundancia de algas. *Table 2. Percentage of total CO_2 fixation carried out by algae, phototrophic and lithotrophic bacteria at the depth of maximal algal abundance.*

Fecha	Porcentajes		
	Algas	Bacterias fototróficas	Bacterias quimiotróficas
17 Jun 86	66	30	4
17 Jul 85	68	25	7
25 Sep 86	48	40	12

Tabla 3. Efecto de distintas sustancias sobre la fijación de CO_2 por muestras tomadas en el punto de máxima abundancia de algas. *Table 3. Effect of different compounds on CO_2 fixation by samples from the algal maximum of abundance.*

Adición	Incorporación de CO_2			
	Algas	Bacterias fototróficas	Bacterias quimiotróficas	Total
Control ^a	12 000	1 600	420	100%
H_2S (0,6 mM)	- 93%	+ 204%	+ 170%	48%
Agua hipolim.	- 6%	+ 101%	+ 201%	101%
Aireación	- 9%	- 26%	- 22%	88%
Agua epilim.	+ 9%	- 34%	- 100%	112%
NH_4 (0,5 mM)	- 46%	- 46%	- 61%	62%

^a Los resultados se dan en cpm para el control (sin adiciones) y como porcentajes el resto. Un signo menos significa inhibición, un signo mas estimulación. *Results are given as cpm for controls (no additions), and as percentages of the control for the experimental vials. A minus sign means inhibition, a plus sign stimulation.*

mayor abundancia de fitoplancton la producción por fotosíntesis oxigénica era normalmente sólo entre el 50 y el 70% de la producción total (Tabla 2).

En la Tabla 3, se resumen los efectos estimulatorios o inhibitorios de distintos compuestos sobre los tres tipos de fijación de carbono. Como cabría esperar, la adición de sulfhídrico, o de agua del hipolimnion (con algo de sulfhídrico) estimulaba la fijación por todas las bacterias dependientes del azufre, tanto las fototróficas como las quimiolitotróficas (fijación oscura), mientras que la oxigenación de la muestra, o la adición de agua del epilimnion (oxigenada) inhibían las fijaciones dependientes del sulfhídrico y no afectaban significativamente a la fotosíntesis oxigénica. Dado que estos experimentos se realizaron con muestras del metalimnion, es lógico que las adiciones de amonio no estimularan la fijación oscura (por bacterias nitrificantes), debido a que la presencia de sulfhídrico impediría la presencia de tales bacterias en el metalimnion. Es más, las concentraciones de amonio añadidas resultaron tóxicas para todos los organismos.

DISCUSIÓN

Como en la laguna de Cisó no hay cianobacterias (PEDRÓS-ALIÓ *et al.* 1987a), la fotosíntesis oxigénica se podía atribuir a las algas y la anoxigénica a las bacterias fototróficas del azufre. De los resultados obtenidos puede deducirse que la fotosíntesis oxigénica es más importante que la anoxigénica durante la estratificación, con máximos en superficie (debido a las acumulaciones temporales de *Carteria*, *Peridinium* y otros) y en el metalimnion debido a *Cryptomonas phaseolus*. Durante la estratificación se puede estimar que este último organismo fija un 65% del total. La fotosíntesis anoxigénica por bacterias del azufre puede representar un 30% de la fijación total durante esta época. Durante la holomixis, en cambio, no se detecta fotosíntesis oxigénica, aunque existe una población de *C. phaseolus* de unas 10^2 células por mL en todo el lago (PEDRÓS-ALIÓ *et al.* 1987b). La fotosíntesis anoxigénica se ve limitada al metro superior debido a la escasa penetración de la luz.

En la laguna de Cisó hay gran abundancia de amonio y sulfhídrico, que en algunas zonas están en contacto con oxígeno, lo cual haría esperar que las bacterias que mas contribuyeran a la fijación oscura de CO_2 fueran las bacterias quimiolitotróficas del nitrógeno (bacterias nitrificantes) y de azufre. Dado que el sulfhídrico es tóxico para la mayor parte de los organismos, es probable que, en presencia de este gas, solamente vivan las bacterias quimiolitotróficas del azufre. En cambio, en el epilimnion, durante el verano, existe gran cantidad de amonio y nada de sulfhídrico, lo que sugiere que las bacterias responsables de la fijación oscura en esta situación sean las bacterias quimiolitotróficas del nitrógeno.

Teniendo en cuenta las mediciones obtenidas y las consideraciones anteriores, se ha construido el modelo de la Fig. 3 que ilustra el fraccionamiento de la producción primaria en la laguna de Cisó durante la holomixis y durante la estratificación. Como puede apreciarse en la figura, durante la holomixis solo existe fijación bacteriana, aproximadamente un 50% por fototrofia y otro 50% por quimiolitotrofia. Toda esta producción tiene lugar únicamente en los 75 a 100 cm superiores de lago. Durante la estratificación, la fotosíntesis oxigénica produce un 65% de la producción primaria, sobretudo en el metalimnion, donde se situa un máximo de *C. phaseolus* (PEDRÓS-ALIÓ *et al.* 1987b). La fotosíntesis anoxigénica con-

tribuye con un 25% en una franja situada por debajo del máximo metalimnético algal, en condiciones crepusculares de luz. La producción por bacterias quimiolitotróficas se reparte entre las bacterias del nitrógeno en el epilimnion (5%) y las del azufre en el metalimnion (otro 5%). Así pues, la producción primaria en el lago Cisó no se debe únicamente a las actividades del fitoplancton, sino que varios grupos de bacterias contribuyen significativamente a la misma.

Figura 3. Modelo que resume las contribuciones de cada grupo microbiano a la fijación total de CO_2 en la laguna de Cisó durante la holomixis (izquierda) y durante la estratificación (derecha). Los sectores indican el porcentaje de la fijación total realizado por algas (punteado), bacterias fototróficas (blanco), bacterias litotróficas del azufre (rayado) y del nitrógeno (negro).

Figure 3. Model summarizing contributions of each group of microorganisms to total carbon fixation during holomixis (left) and stratification (right) in Lake Cisó. Sectors indicate the percent contribution by algae (dotted), phototrophic bacteria (white), and sulfur (stripped) and nitrogen (black) lithotrophic bacteria.

Existen muy pocos datos comparables en la literatura. La mayoría corresponden a lagos situados en la Unión Soviética (véase resumen en

GORLENKO et al. 1983). En dichos lagos, existe una gran variedad de patrones de distribución de la producción primaria entre los distintos procesos microbianos. Por ejemplo, en el lago Konon'er, un lago mesotrófico y mero-míctico, la producción algal asciende al 64%, la fotosíntesis bacteriana representa el 25% y la fijación oscura el 11%. Esta distribución es prácticamente idéntica a la de la laguna del Cisó durante el verano. En cambio, en el lago Maral-Gél', un lago oligotrófico, la fotosíntesis oxigénica representa solamente un 13% del total, la anoxigénica un 34%, y la fijación oscura por *Thiobacillus* el 53% del total. El patrón de distribución invernal en la laguna del Cisó representaría el caso extremo en este sentido de disminución de la fotosíntesis oxigénica, dado que es completamente nula (Fig. 3). La escasez de datos comparativos y lo sorprendente de algunos de estos resultados, resaltan el interés de ampliar este tipo de medidas a un espectro mayor de lagos. Por lo tanto, este tipo de metabolismos deberían tenerse en cuenta al evaluar la producción primaria en lagos con zonas anaeróbicas.

BIBLIOGRAFÍA

- BIEBL, H. & N. PFENNIG. 1979. Anaerobic CO₂ uptake by phototrophic bacteria. A review. *Ergebn. Limnol.*, 12: 48-58.
- CARACO, N. & A.H. PUCCOON. 1986. The measurement of bacterial chlorophyll and algal chlorophyll *a* in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 889-893.
- GORLENKO, V.M., G.A. DUBININA & S.I. KUSNETSOV. 1983. *The ecology of aquatic micro-organisms*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart: 252 pp.
- GUERRERO, R., E. MONTESINOS, C. PEDRÓS-ALIÓ, I. ESTEVE, J. MAS, H. VAN GEMERDEN, P.A.G. HOFMAN & J.F. BAKKER. 1985. Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: Vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.*, 30: 919-931.
- PEDRÓS-ALIÓ, C., J.Ma. GASOL & R. GUERRERO. 1987a. On the ecology of a *Cryptomonas phaseolus* population forming a metalimnetic bloom in Lake Cisó, Spain: Annual distribution and loss factors. *Limnol. Oceanogr.*, 32: (en prensa).
- PEDRÓS-ALIÓ, C., J.Ma. GASOL & R. GUERRERO. 1987b. Microbial ecology of sulfurous Lake Cisó. En F. Megusar (dir.) *Current perspectives in microbial ecology*. Ljubljana: (en prensa).
- REYNOLDS, C.S. 1984. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.: pp.
- ROMANENKO, V.I. 1973. Abundance and production of bacteria in Latvian Lakes. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 18: 1306-1310.
- TAKAHASHI, M. & S. ICHIMURA. 1970. Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 15: 924-944.