

THESE

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES ET SCIENCES DE
L'ENVIRONNEMENT

Par **Mlle Astrid MASSÉ**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : BIOGEOCHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

Ecophysiologie expérimentale des bactéries phototrophes sulfo-oxydantes dans les systèmes sédimentaires

Soutenue le : 18 Mars 2002

Après avis de : MM. P. Caumette
J. Garcia-Gil

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

MM. J.P. Renaudin Professeur

P. Chardy Professeur

R. de Wit Chargé de recherches

P. Caumette Professeur

J. Garcia-Gil Professeur

C. Rabouille Chargé de Recherches

Univ. Bordeaux I

Univ. Bordeaux I

CNRS, Bordeaux

Univ. Pau

Univ. Girona, Espagne

CEA, Gif / Yvette

Président

Examinateur

Examinateur

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier sincèrement Monsieur le Pr. Pierre Chardy pour m'avoir accueillie durant ces quelques années au sein du laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon. Je le remercie également pour avoir accepté de co-diriger cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Rutger de Wit, qui a dirigé ces travaux. Je le remercie vivement pour la confiance qu'il a su m'accorder ces quatre années durant. Merci aussi pour m'avoir permis d'acquérir entre autres une qualité, qui, je l'avoue, m'était jusque là assez étrangère, la patience.

Je remercie sincèrement Messieurs Pierre Caumette et Jesus Garcia-Gil d'avoir accepté la charge de rapporteur de cette thèse, et Monsieur Jean-Pierre Renaudin d'être Président de ce jury.

Monsieur Christophe Rabouille a accepté de faire partie du jury de ce mémoire. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

J'exprime mes profonds remerciements aux équipes de l'Institut Max Planck pour la Microbiologie Marine de Brême et du département de Chimie de l'Université de York.

Merci à Olivier pour sa patience et ses nombreux conseils.

Merci à Evelyne pour le courage et la ténacité qu'elle sait si bien communiquer. Et surtout son calme et sa gentillesse m'ont toujours impressionnée. Je les remercie particulièrement pour les remarques faites lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie particulièrement Madame le Professeur Michèle Capdepuuy. Qu'elle trouve ici toute mon admiration. Je persiste à croire que son arrivée dans le labo restera un jour inoubliable (sans rancune pour le bureau !). Je lui suis reconnaissante pour m'avoir fait confiance et donné l'occasion d'enseigner. J'ai, grâce à elle, acquis une image du « prof » un tout petit peu différente (!!). Je garde en mémoire le petit chat, les petits plateaux repas entre deux TP... et son incomparable façon d'écouter et reconforter les gens.

Merci à Natalie et Florence pour leurs conseils avisés et leurs aide précieuse dans ces derniers moments de rédaction.

Je remercie chaleureusement Yves, même s'il prend toujours un malin plaisir à me mettre en boîte ; juste un grand merci pour son soutien, ses conseils, les fous rires, les repas (un peu chargés!) du vendredi et sa bonne humeur quotidienne.

Je souhaite remercier tous les étudiants de microbiologie qui se sont succédés durant ces années :

Manue, pour avoir partagé, d'une oreille attentive, les aléas de la rédaction, les coups de pompe en direct, les phases d'énerverment à répétition...Mais aussi, nos périodes beaucoup plus drôles de déménagements de bureau (durs, durs les étages ! !), nettoyage, Manu Chao en plein mois d'août (et tout ce qui va avec!)...J'en passe et des meilleures. En tout cas, un grand merci pour son amitié, sa spontanéité et sa justesse. Je te passe la main ; désormais, c'est à toi !

Bruno (le jeune marié), Sandra (bon courage pour la suite), et les petits derniers Aude (pas d'inquiétude pour le bleu du ciel et bonne chance pour la suite!), Jérôme (le dandy de ces dames), Mathilde, Natacha et Vincent.

Et tous les autres :

Maïounette, la bretonne des alpages : tiens bon, tu les auras tous !

Les « colocataires de bureau » :Dorothee et Valérie. Dommage de nous avoir récupérées en période de rédaction ! Une chose est sûre : il n'est jamais trop tard...

En tout cas, promis, pas un mot sur les discussions d'après 18 heures qui fâchent. Quant à Valérie, vive l'humour à deux balles !

Je remercie particulièrement les voyageurs du train de 18h21. Ils ont presque réussi à me faire penser que le trajet était trop court :

Laure, la petite. Au moins avec un chauffeur, je ne risque pas de le rater.

Hugues (non tu ne la liras pas, cette thèse !), et Marc, toujours de mauvaise humeur après 18 heures.

Je souhaite aussi bonne chance à Céline (dans un an, c'est à toi) et remercie Yolanda pour ses conseils avisés des derniers mois (c'est vraiment bien les dates !).

Je tiens à remercier tout le personnel de la Station Marine : Mesdames Cazes, Huet, Massonneau, Moreno, Truong, et Messieurs Bachelet, de Montaudouin, Leconte, Parra et Sautour. Une mention particulière pour Micheline, Marie-Claude (le café du matin, ça fait du bien) et les « hommes de l'atelier », les deux Pascal, Henri et Bruno.

Je remercie particulièrement Line, Yannick, Camille et les petiotes, pour leur amitié et leur soutien.

Je remercie très chaleureusement Thierry qui, même à des milliers de kilomètres trouve le temps et les mots pour me rassurer. Son amitié m'est fort précieuse.

Une mention spéciale pour Valérie et Christophe. Que les dieux du stade soient remerciés. Au moins, pendant le foot, on peut se lâcher. Au fait, c'est quand la prochaine soirée « je critique et ça m'amuse » ? Je les remercie tous les deux pour leur amitié. Valérie, merci pour ta disponibilité, ton oreille attentive, et ton réconfort.

Je tiens à remercier chaleureusement Joelle et Michel qui depuis quatre ans n'ont eu de cesse de m'encourager et me soutenir, en me faisant preuve d'une gentillesse et une compréhension sans égal. Merci de me connaître aussi bien. Un grand merci aussi à Manu, Brigitte, et toute la famille pour leurs encouragements.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien de mes parents. Je tiens à leur exprimer mon immense gratitude. Merci de m'avoir toujours laissée libre de mes choix (parfois à mes dépens). Les années passées ont été riches en moments merveilleux mais aussi, malheureusement parfois très rudes. Cependant, je persiste à croire que le meilleur est à venir.

Et je ne t'oublie pas ma Julie. Tout cela, c'est surtout pour toi. Cette thèse t'est dédiée, tout simplement.

Je vous souhaite à tous les trois le plus grand bonheur du monde.

Enfin, j'exprime tous mes remerciements à Arnaud pour sa patience et son caractère sans pareil. Ca ne doit pas être facile de garder son calme devant quelqu'un qui attend de vous des conseils, mais refuse obstinément de les suivre, juste pour ne pas avouer que vous avez raison. J'admets qu'être du côté de ceux qui subissent ne doit pas être une mince affaire. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance et plus encore. Puisse l'avenir nous donner désormais un peu plus de temps à partager...

A Julie.
A Arnaud.

SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE 4

I. Les communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses. 6

I.1. Les bactéries sulfureuses vertes, Chlorobiaceae 6

I.2. Les bactéries sulfureuses pourpres, Chromatiaceae 7

II. Les pigments des bactéries sulfureuses vertes et pourpres et leur rôle dans la photosynthèse 8

II.1. Description des pigments bactériens 8

II.1.1. Les Bactéριοchlorophylles 8

II.1.2. Les Caroténoïdes 9

II.2. Mécanismes de transferts d'énergie 10

II.2.1. Les Chlorobiaceae 10

II.2.2. Les Chromatiaceae 11

III. Écologie des bactéries phototrophes sulfureuses 12

III.1. Photoadaptation 12

III.2. Notion de pigments biomarqueurs 13

III.3. Écologie en milieu benthique	15
III.3.1. Les tapis microbiens	15
III.3.2. Influence de la lumière	16
III.3.3. Influence des composés soufrés	17
III.3.4. Influence de l'oxygène	18
III.3.5. Influence de la température	19
III.3.6. Autres paramètres	20
III.4. Écologie en milieu pélagique	20
III.4.1. Influence de la lumière	21
III.4.2. Influence des composés soufrés	22
III.4.3. Influence de la salinité	22
III.4.4. Rôle au sein des réseaux trophiques	23
III.4.5. Cas particulier des eaux rouges bactériennes	23
III.5. Interactions entre bactéries pourpres et vertes	24
III.5.1. Compartiment benthique	24
III.5.2. Compartiment pélagique	25
IV. Présentation du travail	26
Références bibliographiques	27
<u>CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	<u>38</u>
I. Présentation des souches bactériennes	39
I.1. Les bactéries sulfureuses vertes: Chlorobiaceae	39
I.2. Les bactéries sulfureuses pourpres : Chromatiaceae	40
II. Techniques de culture	40
II.1. Culture liquide	41
II.1.1. Milieu de culture	42
II.1.2. Maintien des cultures pures de bactéries	

phototrophes sulfureuses	43
II.2. Culture en sédiment artificiel : Les chambres benthiques à gradients	43
II.3. Lumière utilisée pour la culture des bactéries phototrophes	44
II.3.1. Culture liquide	44
II.3.2. Culture en chambre benthique à gradients	45
III. Méthodes d'analyse physiques et chimiques	45
III.1. Dosage des protéines en culture liquide	45
III.2. Mesures électrochimiques et optiques dans le sédiment artificiel (culture en chambre benthique à gradients)	46
III.2.1. Mesures électrochimiques	46
III.2.1.1. L'électrode à oxygène	46
III.2.1.2. L'électrode à pH	46
III.2.1.3. L'électrode à sulfures	47
III.2.1.4. Calculs des taux de consommation d'oxygène et de sulfure (Pringault <i>et al.</i> 1996)	47
III.2.1.5. Calculs des flux de diffusion	48
III.2.2. Mesures optiques	49
III.2.2.1. Mesure de la radiation de champs	49
III.2.2.2. Mesure de l'irradiance scalaire	49
III.2.2.3. Calculs à partir des profils de lumière	49
III.3. Dosage des pigments chlorophylliens et caroténoïdes	50
III.3.1. Chromatographie Liquide Haute Pression UV-Vis (CLHP UV-Vis)	50
III.3.2. Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) et Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (CL-SM)	52
III.3.3. Quantification des pigments	53
Références bibliographiques	54

**CHAPITRE III : ÉTUDE EXPERIMENTALE DE BIOFILMS DE BACTERIES
PHOTOTROPES SULFUREUSES VERTES ET POURPRES CULTIVÉS EN
SÉDIMENT ARTIFICIEL** **58**

Introduction _____ 59

Effet de la qualité lumineuse sur la photo-oxidation du sulfure et la croissance de la bactérie sulfureuse verte *Prosthecochloris aestuarii*, cultivée dans un biofilm artificiel.

Effect of light quality on sulfide photo-oxidation and growth in an artificial biofilm of the Green Sulfur Bacterium Prosthecochloris aestuarii.

Massé A., O. Pringault & R. de Wit, Photosynth. Res., sous presse _____ **61**

Etude expérimentale des interactions entre bactéries sulfureuses vertes et pourpres cultivées dans un sédiment sableux exposé à une illumination dépourvue d'infrarouge.

Experimental Study of Interactions between Purple and Green Sulfur Bacteria in Sandy Sediments exposed to Illumination deprived of Near Infrared

Massé A., O. Pringault & R. de Wit, Appl. Environ. Microbiol., soumis. _____ **79**

Conclusion _____ 102

**CHAPITRE IV : ÉTUDE DE L'ADAPTATION PIGMENTAIRE DES
BACTÉRIES SULFUREUSES VERTES** **103**

Introduction _____ 104

Effet de l'intensité lumineuse sur la composition pigmentaire de deux bactéries sulfureuses vertes cultivées en lumière verte.

*Light intensity effects on the pigment composition of two green sulfur bacteria grown
Prosthecochloris aestuarii and Chlorobium phaeobacteroides under green light*

Massé A. & R. de Wit, In preparation for Microbiology 105

Conclusion 121

CHAPITRE V : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE 122

BIBLIOGRAPHIE 130

ANNEXES : COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS 145

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure I. 1: La molécule de bactériochlorophylle et ses différents substituants associés (voir tableau 2).

Figure I. 2: Photographie d'une cellule de la bactérie sulfureuse verte *Chlorobium tepidum* (d'après Brock & Madigan, 2000). Un des chlorosomes localisés à la périphérie de la cellule est indiqué par la flèche noire.

Figure I. 3: Représentation schématique de la coupe transversale d'un chlorosome et de la membrane cytoplasmique (d'après Brock & Madigan, 2000). BChl, bactériochlorophylle ; Ext., extérieur ; Int., intérieur ; Lb, lamelle basale ; LH, pigments capteurs ; RC, centre réactionnel.

Figure I. 4 Vue de dessus d'un complexe RC / LH1 et un complexe LH2 des bactéries pourpres (d'après Cogdell & Gardiner, 2001). Exemple de *Rhodospseudomonas viridis* : En jaune, la BChl. *a* (B850) ; en rouge, la BChl. *a* (B875) et en violet, les pigments présents dans le centre réactionnel.

Figure I. 5: Les différentes étapes intervenant dans le transfert d'énergie au sein des unités photosynthétiques des bactéries pourpres, observées par photolyse laser flash. Les temps de transfert sont donnés à titre d'exemple chez la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodospseudomonas viridis*. D'après Cogdell & Gardiner (2001).

Figure I. 6: Spectre d'absorption de l'eau pure. D'après Kirk (1994).

Figure II. 1: Photographie de la Chambre Benthique à Gradients (Pringault *et al.* 1996), utilisée pour les cultures de *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 et *Thiocapsa roseopersicina* 5811 en sédiment artificiel ; (1) : compartiment supérieur oxygène ; (2) : carotte de sable ; (3) : compartiment inférieur anoxique ; (4) : arrivée d'air stérile.

Figure II. 2 Spectre de radiance de champs de la lumière utilisée pour les cultures de bactéries phototrophes sulfureuses vertes en milieu liquide.

Figure II. 3: Schéma du protocole d'extraction des pigments avant analyse CLHP UV-Vis et CLHP-SM.

Figure III. 1: Sulfide (●), oxygen (o) and pH (+) profiles in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 cultured in the BGC under visible light (L/D = 16 h - 8 h). Left-hand graph represents situation at the end of the 8 h dark period; right-hand graph represents situation at the end of the 16 h light period. The radiance attenuation profile for 750 nm measured under full light conditions, is given as a proxy for the *P. aestuarii* biofilm location (the attenuation coefficient for sterile sediment is approximately 1 mm^{-1}).

Figure III. 2: Partial HPLC pigment chromatograms obtained from the *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 biofilm cultured in the BGC under visible light (A) and from a liquid batch culture (B) of the same organism cultured under green light at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Other batch cultures grown at higher photon flux densities up to $55.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ showed similar chromatograms as depicted for the current batch culture. Photometric detection was at 440 nm. *c*1, *c*2, *c*3 and *c*4 are different farnesol-esterified homologues of bacteriochlorophyll *c*, 5 and 6 bacteriochlorophyll *a*.

Figure III. 3: Effect of short L/D cycles (30 min L/30 min D) on sulfide profiles in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404. The transient profiles have been obtained from sequential monitoring at different depths (see Methods). The profiles are given for selected depths and represent the transition from dark to light. The time interval between two successive profiles is 2 minutes. A: visible light (culture conditions); B: full light conditions (visible enriched with NIR).

Figure III. 4: Time course of the sulfide photo-oxidation rate upon a shift from dark to light, at the biomass peak, i.e. 2.1 mm, in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 exposed to short L/D cycles (cf. Figure 3). A: visible light (culture conditions); B: full light conditions (visible enriched with NIR).

Figure III. 5: Trajectory of the relationship between the sulfide photo-oxidation and sulfide concentration at the biomass peak, i.e. 2.1 mm in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 exposed to short L/D cycles using full light conditions (visible enriched with NIR, cf. Figure 4B). t_0 , t_1 and t_2 are respectively measurements after 0, 8 and 30 minutes of light exposure.

Figure III. 6: Comparison of the BChl *c* (black color), BChl *a*, Cbt and Okn (gray color) concentrations ($\mu\text{g cm}^{-2}$) in the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (P), the axenic biofilm of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (T), and the mixed culture of both bacteria (PT). Note the different scale for BChl *c* concentration.

Figure III. 7: Comparison of the depth distribution of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 in the axenic biofilm of *P. aestuarii* (P), *T. roseopersicina* (T) and the mixed culture of both bacteria (PT). The depth distribution has been inferred from the partial radiance attenuation for 750 nm (●) and 830 nm (▲) (see text), as proxy for the depth distribution of *P. aestuarii* and *T. roseopersicina*, respectively.

Figure III. 8: Comparison of sulfide (up triangle) and oxygen (circle) profiles in the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (P), in the axenic biofilm of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (T) and the mixed culture of both bacteria (PT), cultured in the BGC under visible light (L/D = 16 h / 8 h). (▲) and (●) represent situation at the end of the 8 h dark period; (△) and (○) represent situation at the end of the 16 h light period.

Figure III. 9: Effect of short L/D cycles (30 min L / 30 min D) on sulfide profiles in the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (left panel, P), *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (right panel, T) and the mixed culture of both bacteria (medium panel, PT). The transient profiles have been obtained from sequential monitoring at different depths (see Methods). The profiles are given for selected depths and represent the transition from dark to light. The time interval between two successive profiles is 2 minutes. (A): visible light (culture conditions); (B): full light conditions (visible enriched with NIR light).

Figure III. 10: Distribution of PAR (■) and NIR (●) radiation ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) measured under culture conditions, and NIR radiation (○) measured under full light conditions at different depths within the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain

CE 2404 (P), the axenic biofilm of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (T) and the mixed biofilm of both bacteria (PT).

Figure IV. 1: HPLC-UV Vis chromatogram (300-800 nm) of pigment extracts from *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 grown at (a) 9.2 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ and (b) 1.2 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. The detection was operated at 440 nm. For peak assignment see table 1.

Figure IV. 2: Total Bacteriochlorophyll *c* specific content of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 grown at the different light intensities tested.

Figure IV. 3: Proportion of the different farnesyl esterified forms of Bacteriochlorophyll *c* of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 grown at the different light intensities tested. The different color correspond to the substituent group at positions C-8 and C-12. In black : C-8 = Ethyl, C-12= Methyl; in white : C-8 = Ethyl and C-12 = Ethyl or C-8 = Propyl and C-12 = Methyl; in gray : C-8 = Propyl and C-12 = Ethyl or C-8 = Butyl and C-12 = Methyl.

Figure IV. 4: HPLC-UV Vis chromatogram (300-800 nm) of pigment extracts from *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at 3.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Detection was operated at 440 nm. For peak assignment see table 2.

Figure IV. 5: Total Bacteriochlorophyll *e* specific content of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at the different light intensities tested.








Figure IV. 6: Proportion of the different esterified forms of Bacteriochlorophyll *e* of pigment extracts from *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at the different light intensities tested. (a): The proportion of linear alcoholic esterified homologues of BChl. *e*;  : C16:1;  : C15:1;  : C15;  : C16;  : C17. (b): The proportion of the cyclic esterified homologues of BChl. *e*.  : esterifying alcohol = farnesol;  : esterifying alcohol = geranylgeranol.

Figure V. 1: Schéma conceptuel de la croissance des bactéries phototrophes sulfureuses vertes, *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 (*Ptc.*) et pourpres, *Thiocapsa roseopersicina* 5811

(*Tca.*) dans les écosystèmes aquatiques: Rôle de la lumière et des paramètres physico-chimiques dans des sédiments exondés (a), submergés par une colonne d'eau de 0.5 à 1 mètre (b) et supérieure à 1 mètre (c). V:Vis (visible); N: NIR (proche infrarouge).

Tableau I. 1: Caractéristiques physiologiques et biochimiques principales des bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses vertes et pourpres (modifié d'après Guyoneaud, 1996).

Tableau I. 2: Les différents substituents de la molécule de bactériochlorophylle (modifié d'après Frigaard, 1997 et Brock, 2000; la numérotation des atomes de carbone est réalisée selon le système IUPAC).

Tableau I. 3: Les principaux caroténoïdes des bactéries sulfureuses vertes et pourpres et leurs voies biosynthétiques (d'après Pfennig, 1978; Schmidt, 1978 et Schmidt, 1994).

Table III. 1: Scalar irradiance and maximum sulfide oxidation rates measured under culture and full light conditions, at different depths (top, biomass peak and bottom) within the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404.

Table III. 2: Comparison of biofilm location, biomass peak, radiance attenuation coefficient at the biomass peak and maximum oxygen penetration depth in the BGC cultures of *Prosthecochloris aestuarii* as a function of light used during the culturing.

Table III. 3: Zero-order reaction rate and integrated rate of O₂ respiration and H₂S oxidation, and oxygen and sulfide diffusive fluxes in the axenic biofilm (T) of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 and the mixed culture (PT) of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 and *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404.

Table IV. 1: Assignment of pigments of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404.

Table IV. 2: Assignment of pigments of *Chorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030.

INTRODUCTION

Les bactéries phototrophes anoxygéniques sulfo-oxydantes prolifèrent dans les zones anoxiques des environnements aquatiques, exposés à la fois à la lumière et à d'importantes concentrations en sulfure. Parmi les environnements pélagiques, la colonne d'eau des lacs, lagunes ou autres mers fermées constitue un réel refuge pour ces micro-organismes qui s'y développent sous forme de véritables plaques ou couches bactériennes. Les systèmes sédimentaires peu profonds constituent quant à eux, une niche écologique précieuse pour ces mêmes micro-organismes qui se développent juste au dessous de la surface, à la limite oxiq-anoxiq sous forme de structures particulières appelées biofilms ou tapis microbiens, au sein desquelles les micro-organismes ont su développer des mécanismes adaptatifs leur permettant de s'affranchir des gradients inhérents au compartiment benthique, lumière, oxygène, pH, sulfure...

La lumière constitue la principale source d'énergie pour la croissance des bactéries phototrophes sulfureuses. Dans le milieu naturel, la colonne d'eau absorbe les rayons infrarouge (IR) alors que dans le sédiment ce sont les rayons UV et bleus qui sont atténués le plus rapidement. Les bactéries phototrophes sulfureuses vertes et pourpres situées dans le sédiment de surface connaissent donc des conditions lumineuses mixtes distribuées sur tout le spectre lumineux (UV + IR). Quelques études descriptives ont reporté l'impact de ces conditions lumineuses sur la distribution, la modification de la composition pigmentaire et l'activité photosynthétique des bactéries sulfureuses vertes dans les systèmes sédimentaires (Pierson *et al.* 1987, 1990). De même, avec le développement de nouveaux systèmes de culture en sédiment artificiel (Pringault *et al.* 1996), on a pu étudier, de manière expérimentale, la croissance et l'activité photosynthétique des bactéries sulfureuses vertes et pourpres (Pringault *et al.* 1998, 1999).

Les environnements benthiques peu profonds sont continuellement exposés à des fluctuations de la profondeur de la colonne d'eau, entraînant ainsi des variations de l'atténuation de la lumière. Aussi, la proportion des rayons infrarouge (>740 nm) peut être atténuée jusqu'à 1% de sa valeur en surface, suite à l'atténuation par une colonne d'eau de profondeur supérieure à 1 mètre (Kirk, 1994). On ne retrouve alors dans ce cas au niveau de la surface du sédiment, qu'une très faible proportion d'infrarouge. Au contraire, la proportion de rayons visible, et notamment verts, est plus importante, ce qui constitue des conditions critiques pour la croissance des bactéries sulfureuses vertes et pourpres dans les systèmes.

Dans ce travail, nous nous proposons de déterminer comment des variations de la profondeur de la colonne d'eau peuvent influencer sur la croissance et l'activité photosynthétique des bactéries phototrophes sulfo-oxydantes dans les systèmes sédimentaires.

Pour cela, nous nous proposons dans un premier temps de simuler les conditions lumineuses présentes dans les systèmes profonds, donc dépourvues de longueurs d'ondes proches de l'infrarouge sur la croissance et l'activité photosynthétique de la bactérie sulfureuse verte *Prosthecochloris aestuarii* cultivée dans un sédiment artificiel.

Les bactéries sulfureuses vertes et pourpres coexistent au sein des biofilms ou des tapis microbiens. De ce fait, il nous a paru intéressant de tester les conditions lumineuses critiques sus-citées sur la stratification et les interactions au sein d'un biofilm mixte de la bactérie sulfureuse verte précédemment étudiée et d'une bactérie sulfureuse pourpre, respectivement *Prosthecochloris aestuarii* et *Thiocapsa roseopersicina*.

L'intensité lumineuse a un rôle majeur sur la distribution et les mécanismes d'adaptation pigmentaire des bactéries sulfureuses vertes dans le milieu pélagique naturel. (Vila & Abella, 1993, 1994; Borrego & Garcia-Gil, 1995; Borrego *et al.* 1993, 1997). Finalement, la dernière partie de ce travail sera consacrée à l'étude de l'effet du couplage qualité/intensité lumineuse critiques en analysant l'adaptation pigmentaire des bactéries sulfureuses vertes *Prosthecochloris aestuarii* et *Chlorobium phaeobacteroides*, cultivées en culture liquide.

Références bibliographiques

- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Vila X., Cristina X.P., Figueras J.B. & Abella C.M. 1997. Distribution of bacteriochlorophyll homologs in natural populations of brown-colored phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 301-309.
- Borrego, C.M. & Garcia-Gil J. 1995. Rearrangement of light harvesting bacteriochlorophyll homologues as a response of green sulfur bacteria to low light intensities. *Photosynth. Res.* **45**: 21-30.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Bañeras L. & Brunet R.C. 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of Lake Banyoles (Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25** : 720-725.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, 2^d edn. Cambridge University Press, Cambridge.

- Pierson, B. K., Sands V.M.& Frederick J.L. 1990. Spectral Irradiance and Distribution of Pigments in a Highly Layered Marine Microbial Mat. *Appl. Env. Microbiol.* **56**(8): 2327-2340.
- Pierson, B., Oesterle A. & Murphy G.L. 1987. Pigments, light penetration, and photosynthesis activity in the multi-layered microbial mats of Great Sippewissett Salt Marsh, Massachusetts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 365-376.
- Pringault, O., de Wit R. & Kühl M. 1999. A Microsensor Study of the Interactions between Purple Sulfur and Green Sulfur Bacteria in Experimental Benthic Gradients. *Microb. Ecol.* **37** : 173-184.
- Pringault, O., Kühl M., de Wit R. & Caumette P. 1998. Growth of green sulphur bacteria in experimental benthic oxygen, sulphide, pH and light gradients. *Microbiology* **144**: 1051-1061.
- Pringault, O., de Wit R., & Caumette P. 1996. A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 237-250.
- Vila, X. & Abella C.A. 1994. Effect of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynhtesis Research* **41**(1): 53-65.
- Vila, X. & Abella C.A. 1993. Comparison of light spectral distribution in some waterbodies of Banyoles area (Girona, Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 100-104.

CHAPITRE I

EXPOSE BILIOGRAPHIQUE

I. Les communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques	6
I.1. Les bactéries sulfureuses vertes, Chlorobiaceae	6
I.2. Les bactéries sulfureuses pourpres, Chromatiaceae	7
II. Les pigments des bactéries sulfureuses vertes et pourpres et leur rôle dans la Photosynthèse	8
II.1. Description des pigments bactériens	8
II.1.1. Les Bactériochlorophylles	8
II.1.2. Les Caroténoïdes	9
II.2. Mécanismes de transferts d'énergie	10
II.2.1. Chlorobiaceae	10
II.2.2. Chromatiaceae	11
III. Écologie des bactéries phototrophes sulfureuses vertes et pourpres	12
III.1. Photo-adaptation	12
III.2. Notion de pigments biomarqueurs	13
III.3. Écologie en milieu benthique	15
III.3.1. Les tapis microbiens	15
III.3.2. Influence de la lumière	16
III.3.3. Influence des composés soufrés	17
III.3.4. Influence de l'oxygène	18
III.3.5. Influence de la température	19
III.3.6. Autres paramètres	20
III.4. Écologie en milieu pélagique	20
III.4.1. Influence de la lumière	21
III.4.2. Influence des composés soufrés	22
III.4.3. Influence de la salinité	22
III.4.4. Rôle au sein des réseaux trophiques	23
III.4.5. Cas particulier des eaux rouges bactériennes	23
III.5. Interactions entre bactéries sulfureuses vertes et pourpres	24
III.5.1. Compartiment benthique	24
III.5.2. Compartiment pélagique	25
IV. Présentation du travail	26
Références bibliographiques	27

Dans ce premier chapitre, nous nous intéressons à la physiologie et l'écologie des bactéries phototrophes anoxygéniques et plus particulièrement, des bactéries sulfureuses vertes et pourpres. La première partie sera donc consacrée à une présentation phylogénétique et taxonomique des bactéries sulfureuses vertes et pourpres incluant les critères généraux permettant de distinguer la famille des Chlorobiaceae de celle des Chromatiaceae. La seconde partie de ce chapitre sera plus particulièrement consacrée à l'étude des pigments des bactéries sulfureuses vertes et pourpres, mettant en évidence un inventaire des pigments majeurs retrouvés pour chaque famille, et le principe des mécanismes de transfert d'énergie intervenant dans les processus photosynthétiques réalisés chez ces organismes. Dans la troisième partie nous reviendrons dans un premier temps sur l'implication écologique des pigments et leur utilité comme biomarqueurs des bactéries phototrophes sulfureuses. Puis, nous traiterons de l'écologie des bactéries phototrophes sulfureuses, d'une part en milieu benthique, à l'interface eau-sédiment et d'autre part en milieu pélagique, au sein de la colonne d'eau. Nous étudierons ensuite les interactions entre les bactéries sulfureuses vertes et pourpres pouvant avoir lieu au sein de ces écosystèmes. Finalement, ce chapitre sera conclu par une présentation du travail effectué lors de cette thèse.

Tableau I. 1: Caractéristiques physiologiques et biochimiques principales des bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses vertes et pourpres (modifié d'après Guyoneaud, 1996).

Microorganismes	Mode d'oxydation du sulfure	Donneur d'électrons	Source de carbone	Localisation de l'appareil photosynthétique	Pigments
<i>Chlorobiaceae</i>	Photolithotrophie	H ₂ S / S ⁰ , H ₂ (organique)	CO ₂	Chlorosome	BChl. <i>a</i> , BChl. <i>c</i> / <i>d</i> / <i>e</i> , Chl. <i>a</i> , caroténoïdes
<i>Chromatiaceae</i>	Photo- / Chimiolithotrophie	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ , H ₂ (organique)	CO ₂ , organique	Vésicules, lamelles, tubules	BChl. <i>a</i> / <i>b</i> , caroténoïdes

I. Les communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques.

Actuellement, la phylogénie bactérienne est établie à partir de l'ARNr 16S. Les bactéries phototrophes anoxygéniques ou Anoxyphotobacteriae constituent un groupe microbien phylogénétiquement hétérogène au sein du domaine des Bacteria. Chaque micro-organisme se distingue dans un premier temps de par ses caractéristiques morphologiques, physiologiques et moléculaires (Imhoff, 1995). D'autre part, une distinction supplémentaire s'effectue selon la structure moléculaire de l'appareil photosynthétique et des pigments qu'il contient. Parmi les bactéries phototrophes anoxygéniques, on discerne tout d'abord la branche des Proteobacteria regroupant de façon générale, toutes les bactéries pourpres. On y retrouve d'une part les bactéries pourpres non sulfureuses dispersées dans les branches α et β , et représentées par la famille des Rhodospirillaceae. D'autre part, les bactéries pourpres sulfureuses qui se retrouvent dans la branche γ des Proteobacteria. Parmi ces dernières, on distingue les familles des Chromatiaceae et des Ectothiorhodospiraceae stockant le sulfure respectivement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Les bactéries phototrophes anoxygéniques vertes constituent un groupe phylogénétiquement homogène et distant de celui des bactéries phototrophes anoxygéniques pourpres. En effet, les bactéries vertes sulfureuses représentent à elles seules, une seule branche du domaine des Bacteria et comprennent une famille unique : la famille des Chlorobiaceae. Les Heliobacteria constituent un groupe phylogénétiquement distinct des deux premiers, relié aux bactéries gram positives. Enfin, les bactéries vertes non sulfureuses ou Chloroflexaceae forment le dernier groupe lui aussi isolé et phylogénétiquement distant de tous les autres (Madigan & Ormerod, 1995).

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons aux bactéries participant de façon quasi-exclusive au cycle du soufre, c'est-à-dire, les bactéries vertes sulfureuses ou Chlorobiaceae et les bactéries pourpres sulfureuses de la famille des Chromatiaceae, dont les principales caractéristiques biochimiques et physiologiques sont rappelées dans le **tableau I. 1**.

I.1. Les bactéries sulfureuses vertes : Chlorobiaceae

Les bactéries vertes sulfureuses ou Chlorobiaceae, sont des organismes anaérobies stricts, qui de ce fait, ne se retrouvent exclusivement qu'au niveau de l'interface oxiq-anoxique du sédiment de surface ou bien, à la limite des eaux anoxiques inférieures et des eaux oxiqes supérieures des lacs stratifiés. Ces organismes utilisent le soufre mais aussi

principalement le sulfure comme donneur d'électrons pour la photosynthèse (Trüper & Pfennig, 1992). Le métabolisme des Chlorobiaceae est de type photolithoautotrophe. La photoassimilation de l'acétate est néanmoins possible. Cependant, elle nécessite la présence conjointe de sulfure et CO₂. Aussi, le CO₂ reste la principale source de carbone, fixée dans le sens inverse du cycle des acides tricarboxyliques sans intervention de l'enzyme Rubisco. Le sulfure, en présence de CO₂ et de lumière (source d'énergie), est oxydé en sulfate puis en soufre élémentaire. Ce dernier est alors stocké sous forme de globules extracellulaires. Les pigments sont contenus dans des structures photosynthétiques particulières appelées chlorosomes, retrouvés aussi chez les bactéries vertes filamenteuses (Blankenship *et al.* 1995). Ce sont des structures cylindriques composées d'éléments tubulaires, connectées à la lamelle basale hydrophile, elle-même rattachée à la paroi cellulaire par de grandes particules (diamètre = 12 nm) appelées centres réactionnels (Gregory, 1989). Ces unités photosynthétiques contiennent les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (voir chapitre I, partie II.1), et ont pour fonction de permettre à la fois l'absorption de l'énergie lumineuse et son transfert vers le centre réactionnel photosynthétique. Parmi les bactéries vertes sulfureuses, on distingue, en fonction des pigments qu'elles contiennent, i) les Chlorobiaceae vertes contenant majoritairement de la Bactériorchlorophylle (BChl.) *c* et / ou la BChl. *d* et des caroténoïdes (Car.) de la série du chlorobactène et, ii) les Chlorobiaceae brunes contenant majoritairement de la BChl. *e* et des caroténoïdes de la série de l'isoréniératène.

I.2. Les bactéries sulfureuses pourpres, Chromatiaceae

Les bactéries pourpres sulfureuses ou Chromatiaceae sont des micro-organismes dont la couleur peut varier du rouge au brun en fonction de leur composition en caroténoïdes (Gregory, 1989). Les facteurs environnementaux majeurs conditionnant leur développement en milieu aquatique sont principalement la présence de sulfure et de lumière (Trüper & Pfennig, 1992). Tout comme chez les Chlorobiaceae, la majorité des représentants des Chromatiaceae affiche, en conditions anaérobies, un métabolisme photolithoautotrophe utilisant, un composé soufré tel que le sulfure, le thiosulfate, le sulfite ou le soufre élémentaire comme donneur d'électrons pour la photosynthèse. En présence de CO₂ ou d'un autre composé organique, et de lumière, le composé soufré est oxydé en soufre élémentaire stocké sous forme de globules intracellulaires, puis en sulfate. Contrairement aux Chlorobiaceae, chez les Chromatiaceae, le CO₂ est fixé lors du cycle des pentoses-phosphates. Parallèlement

à ce métabolisme photolithoautotrophe, certains micro-organismes de la famille des Chromatiaceae présentent un métabolisme versatile et sont ainsi capables, en conditions aérobies, de croître par chimiolithotrophie ou chimioorganotrophie. Le genre *Thiocapsa* (voir chapitre III) fait partie de ces organismes à métabolisme versatile (van Gemerden & de Wit, 1989). L'appareil photosynthétique contenant les pigments majeurs est formé par des invaginations de la membrane cytoplasmique, prenant la forme de vésicules, de lamelles ou de tubules intracytoplasmiques où l'on retrouve la Bactéριοchlorophylle *a* et les caroténoïdes de la série de l'okénone ou de la spirilloxanthine (voir chapitre I, partie II.1 et **tableau I. 1**).

Dans les systèmes naturels pélagiques ou benthiques, il est fréquent de retrouver les bactéries sulfureuses vertes coexistant avec les bactéries pourpres et développant des relations de compétition à la fois pour la lumière et le sulfure, tous deux essentiels à leur métabolisme photolithoautotrophe. Cet aspect de coexistence et interaction entre bactéries sulfureuses vertes et pourpres sera ultérieurement étudié au chapitre I, partie III.5.

II. Les pigments des bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses et leur rôle dans la photosynthèse.

Les bactéries sulfureuses vertes et pourpres possèdent deux types de pigments : les bactéριοchlorophylles et les caroténoïdes (**tableau I. 1**).

II.1. Description des pigments bactériens

II.1.1. Les Bactéριοchlorophylles

Les bactéριοchlorophylles sont des pigments vert-bruns, majeurs chez les Chlorobiaceae vertes auxquelles ils confèrent une couleur caractéristique. Au contraire, chez les Chlorobiaceae brunes et les Chromatiaceae, les pigments majeurs sont les caroténoïdes, dont la forte proportion masque les bactéριοchlorophylles. Les bactéριοchlorophylles sont classées, de par leur structure chimique, en deux groupes majeurs. Le premier comprend notamment la BChl. *b* et la BChl. *a*, cette dernière étant présente en faible quantité chez les Chlorobiaceae et en plus grande proportion chez les bactéries pourpres. Le second groupe comprend les autres types de bactéριοchlorophylles : la BChl. *c*, pigment majoritaire des bactéries vertes et les BChls, *d* et *e*. La distinction entre ces deux groupes de molécules

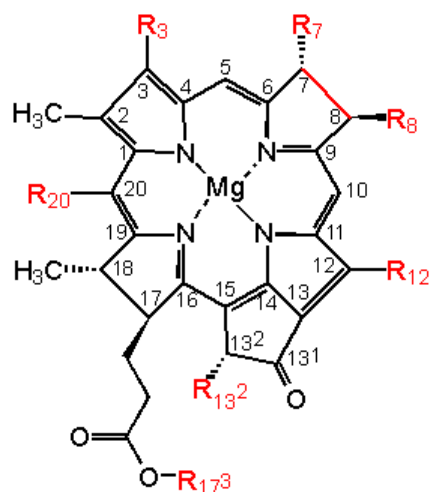


Figure I. 1: La molécule de bactériochlorophylle et ses différents substituants associés (voir tableau 2).

Tableau I. 2: Les différents substituants des molécules de bactériochlorophylle (modifié d'après Frigaard, 1997 et Brock, 2000 ; la numérotation des atomes de carbone est réalisée selon le système IUPAC).

Composé	R ₃	R ₇	R ₈	R ₁₂	R ₁₃	R ₁₇	R ₂₀	<i>In vivo</i> Infrared absorption maxima (nm)
BChl. <i>a</i> *	-CO-CH ₃	M	E	M	-CO-O-CH ₃	P / Gg	H	805 830-890
BChl. <i>b</i> *	-CO-CH ₃	M	=CH-CH ₃	M	-CO-O-CH ₃	P	H	835-850 1020-1040
BChl. <i>c</i>	-CHOH-CH ₃	M	E, Pr, I	M, E	H	F + autres	M	745-755
BChl. <i>d</i>	-CHOH-CH ₃	M	E, Pr, I, N	M, E	H	F + autres	H	705-740
BChl. <i>e</i>	-CHOH-CH ₃	-CHO	E, Pr, I, N	M	H	F + autres	M	719-726

*Pas de double liaison entre C₇ et C₈ .

Abbreviations: BChl., Bactériochlorophylle; E, Ethyl; F, Farnesyl (C₁₅H₂₅O-); Gg, Geranylgeranyl (C₂₀H₃₃O-); H, Hydrogen; I, Isobutyl (2-methylpropyl); M, Methyl; N, Neopentyl (2,2-dimethylpropyl); P, Phytol (C₂₀H₃₉O-); Pr, Propyl.

s'effectue tout d'abord du point de vue de leur structure chimique (**figure I. 1** et **tableau I. 2**). En effet, les BChls *a* et *b* se présentent sous forme d'un macrocycle réduit en position C7 et C8, autrement nommé noyau tetrahydroporphyrine ou bactériochlorine (Senge & Smith, 1995). En ce qui concerne le second groupe de BChls *c*, *d*, et *e*, la molécule est constituée d'un macrocycle dihydroporphyrine ou chlorine, structure identique à celle retrouvée chez la chlorophylle *a*. La seconde distinction des bactériochlorophylles réside dans leur fonctionnalité. En effet, chez les bactéries vertes, tandis que les BChls *c*, *d*, et *e* présentes dans les chlorosomes, ont pour rôle de capter l'énergie lumineuse et de la transférer au centre réactionnel, la BChl. *a* récupère cette énergie et permet alors l'enchaînement des réactions photosynthétiques. Chez les bactéries pourpres, la BChl. *a* est présente à la fois dans le centre réactionnel et le complexe antennaire.

Les BChl. *c*, *d*, et *e* peuvent se présenter, au sein d'une même espèce, sous diverses formes moléculaires, nommées homologues, en fonction de l'alcool estérifié en position R₇ et du substituant alkyl présent en position R₈ et / ou R₁₂ (Smith, 1994). Par exemple, la BChl. *e* peut être définie comme un mélange de plus de 15 homologues dont la différence essentielle porte sur l'alkylation en position C8 et C12 et la nature de l'alcool estérifié en position C17 (Borrego *et al.* 1999). Il est important de noter que plusieurs études récentes sur les bactéries sulfureuses vertes (Borrego *et al.* 1994 ; Borrego, 1996 ; Airs *et al.* in press, Borrego *et al.* 1998) ont montré qu'il existe dans le milieu naturel, une très grande richesse de formes d'alcools estérifiées. Aussi, avec le développement de nouvelles techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse, il est désormais possible d'identifier les formes présentes chez d'autres organismes du milieu naturel. Loin d'être un critère élémentaire dans la distinction des espèces bactériennes, la distribution de ces homologues reste néanmoins un critère écologique important puisque plusieurs études ont montré que la distribution et la proportion de ces homologues varient en fonction des conditions lumineuses sous lesquelles les micro-organismes se développent (Borrego *et al.* 1997).

II.1.2. Les Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments jaunes-orangés à rouge dont la nature et la quantité ont longtemps constitué un critère de taxonomie autrefois fort reconnu (Schmidt *et al.* 1994). Chez les bactéries sulfureuses vertes et pourpres, les caroténoïdes représentent les premiers capteurs de photons. Chez les Chlorobiaceae, les photons sont ensuite transmis à la BChl. *c* puis la BChl. *a* selon le schéma suivant (Blankenship *et al.* 1995) :

Tableau I. 3: Les principaux caroténoïdes des bactéries sulfureuses vertes et pourpres et leurs voies biosynthétiques (d'après Pfennig, 1978; Schmidt, 1978; Schmidt et al. 1994).

Séries biosynthétiques	Caroténoïdes	Microorganismes
Série du chlorobactène	γ - carotène, (hydroxy)-chlorobactène	Chlorobiaceae
Série de l'isoréniératène	β -carotène, isoréniératène	Chlorobiaceae
Série de l'okénone	Okénone	Chromaticaeae
Série de la spirilloxanthine	Lycopène, rhodopine, spirilloxanthine	Chromaticaeae

carotenoid \rightarrow BChl. *c* \rightarrow BChl. *a* baseplate \rightarrow BChl. *a* cytoplasmic membrane \rightarrow BChl.*a* reaction center .

En outre, une grande diversité de ces pigments à rôle photo-protecteurs, est synthétisée via divers processus chez les bactéries photosynthétiques (Young *et al.* 1993), et notamment les bactéries sulfureuses vertes et pourpres auxquelles nous nous intéressons. Alors que les bactériochlorophylles sont constituées d'un noyau cyclique, tous les caroténoïdes ont une structure dérivée d'une structure linéaire de type isoprénoïde à 40 atomes de carbone. Néanmoins, dans certains cas, cette chaîne peut être affectée d'un groupement cyclique soit à une extrémité de la chaîne, soit aux deux. Aussi, chez les Chlorobiaceae, une nouvelle distinction s'effectue. Chez les chlorobiaceae vertes, on retrouve majoritairement des caroténoïdes de la série du chlorobactène incluant notamment le γ -carotène alors que chez les chlorobiaceae brunes, les caroténoïdes majeurs sont ceux dérivant de la série de l'isorénieratène, dont le β -carotène fait partie. En ce qui concerne les bactéries sulfureuses pourpres, la majorité des caroténoïdes qui y sont présents dérivent de la série de l'okénone ou de la spirilloxanthine (**tableau I. 3**).

II.2. Mécanismes de transfert d'énergie

II.2.1. Les Chlorobiaceae

Comme nous l'avons précédemment remarqué, le système photosynthétique des bactéries sulfureuses vertes a fait l'objet de nombreuses études de par la complexité des mécanismes de transfert d'énergie impliqués lors des réactions photosynthétiques. Ainsi, chez ces micro-organismes, l'appareil photosynthétique est constitué de différentes unités : les complexes antennaires photosynthétiques caractéristiques ou chlorosomes contenant les bactériochlorophylles, la protéine FMO (Fenna-Matthews-Olson) et les centres réactionnels. Les chlorosomes sont des structures tubulaires situées à la périphérie de la membrane cytoplasmique (**figure I. 2**), rattachées à cette dernière au niveau de la lamelle basale (**figure I. 3**). C'est à l'intérieur du chlorosome que l'énergie lumineuse est captée via les molécules de BChl. *c*. L'énergie est ensuite transférée via la BChl. *a* située au niveau de la lamelle basale vers la BChl. *a* associée à la protéine FMO, elle-même localisée entre les chlorosomes et la membrane. Finalement, l'énergie lumineuse est transférée vers le centre réactionnel (RC) localisé dans la membrane cytoplasmique (Sybesma & Olson, 1963 ; Tokita *et al.* 1999). Le centre réactionnel des bactéries sulfureuses vertes est donc une protéine membranaire intrinsèque qui contient à la fois le centre réactionnel photosynthétique et un grand nombre de

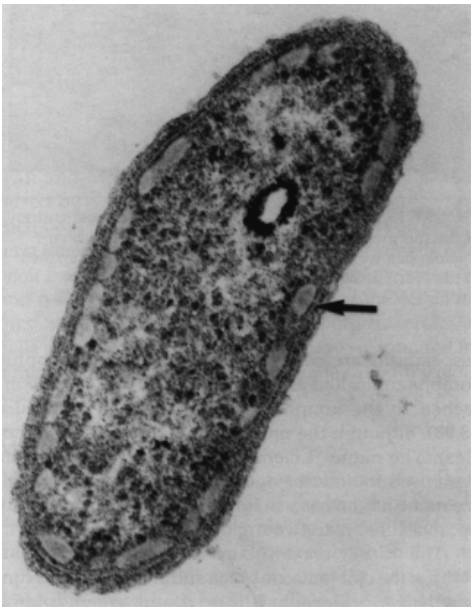


Figure I. 2: Photographie d'une cellule de la bactérie sulfureuse verte *Chlorobium tepidum* (d'après Brock & Madigan, 2000). Un des chlorosomes localisés à la périphérie de la cellule est indiqué par la flèche noire.

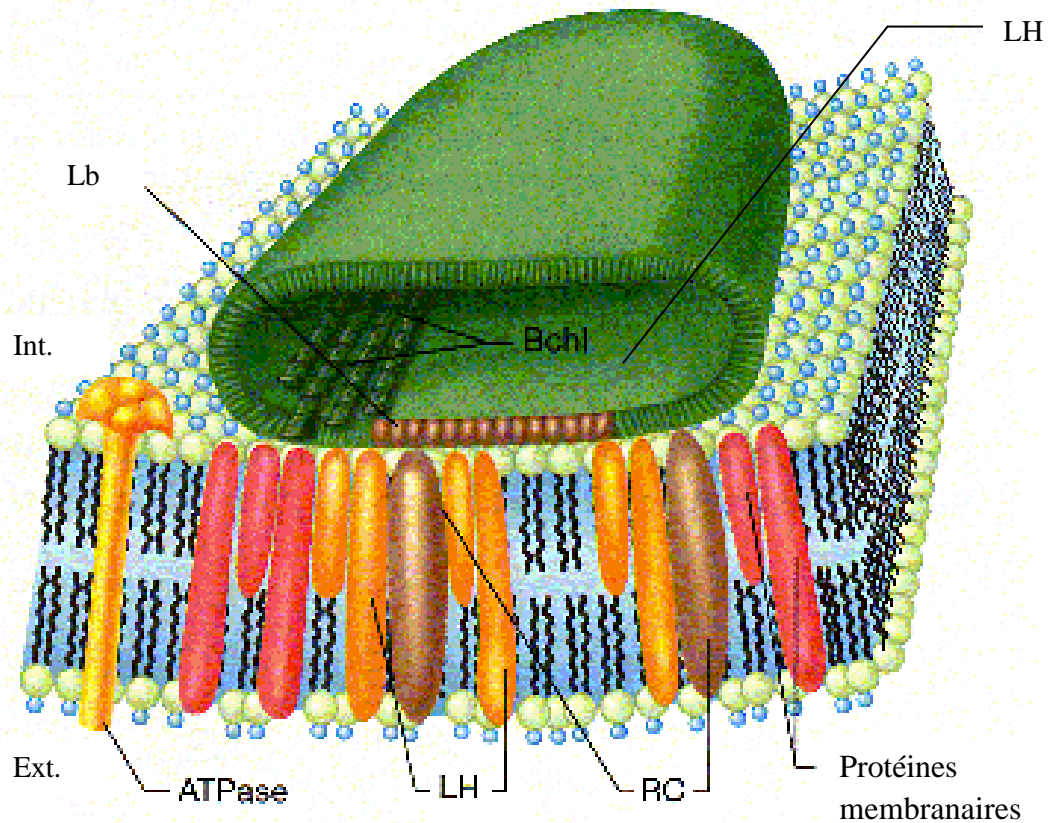


Figure I. 3: Représentation schématique de la coupe transversale d'un chlorosome et de la membrane cytoplasmique (d'après Brock & Madigan, 2000).

BChl, bactériochlorophylle; Ext., extérieur; Int., intérieur; Lb, lamelle basale; LH, pigments capteurs; RC, centre réactionnel.

pigments dits antennaires (Schmidt *et al.* 2000). Le centre réactionnel des bactéries sulfureuses vertes est de type RC1, présentant un accepteur d'électron à bas potentiel fer-sulfure, formé de 16 molécules de BChl *a* dont deux constituent le premier donneur d'électron P840 ainsi que de quatre molécules de Chlorophylle (Chl.) *a*, constituant l'accepteur d'électron de la chaîne photosynthétique (Schmidt *et al.* 2000). Ainsi, une fois l'énergie lumineuse transférée via la protéine FMO dans le RC, celui-ci stocke alors cette énergie sous forme ferredoxine par transport d'électrons linéaires et par transport cyclique sous forme de force motrice permettant la réalisation des échanges ioniques de part et d'autre de la membrane cytoplasmique et la formation d'ATP. En conditions réduites, l'énergie est alors captée par le P840, premier donneur d'électron de la chaîne photosynthétique, induisant ainsi la séparation des complexes fer-sulfure de la membrane et leur transformation en ferredoxine soluble (Frigaard & Mastuura, 1999). Concernant l'efficacité de ce transfert d'énergie, de récentes études (Melø *et al.* 2000) ont montré que chez deux espèces de bactéries sulfureuses vertes, *Chlorobium tepidum* et *Chloroflexus aurantiacus*, le transfert d'énergie depuis les caroténoïdes vers la BChl. *c* puis la BChl. *a*, était effectué avec une activité maximale de 100% de photon transféré par photon capté, rarement rencontrée chez d'autres micro-organismes.

Bon nombre d'études ont été réalisées sur les mécanismes de transfert de photons chez les bactéries vertes sulfureuses. Ainsi, Steensgaard *et al.* (1999, 2000) ont mis en évidence un transfert d'énergie significatif et constant d'environ 4 ps, entre la BChl. *d* et la BChl. *c* comprises en proportion égales (50%) dans les chlorosomes de *Chlorobium limicola*.

II.2.2. Les Chromatiaceae

L'appareil photosynthétique des bactéries sulfureuses pourpres est tout comme chez les bactéries sulfureuses vertes, formé d'une unité photosynthétique comprenant un complexe (LH) ayant pour fonction de capter la lumière et un centre réactionnel (RC). Chez les Chromatiaceae et la plupart des bactéries pourpres, il existe deux types de complexes captant l'énergie lumineuse, les complexes LH1 et LH2, oligomères de polypeptides (α et β apoprotéines) construits sur un principe modulaire identique (Zuber & Cogdell, 1995; Cogdell & Gardiner, 2001). Le complexe LH1 est étroitement lié au centre réactionnel pour former un noyau LH1-RC (**figure I. 4**). Au contraire, les complexes LH2 gravitent de façon continue à la périphérie du noyau LH1-RC. Les deux complexes sont alors mis en jeu lors des mécanismes de transfert de l'énergie lumineuse. Le complexe LH1 est formé de molécules de bactériochlorophylle absorbant à 875 nm (B875). Au contraire, le complexe LH2 est composé



Figure I. 4: Vue de dessus d'un complexe RC / LH1 et un complexe LH2 des bactéries pourpres, (d'après Cogdell & Gardiner, 2001). Exemple de *Rhodospseudomonas viridis* : En jaune, la BChl. *a* (B850); en rouge, la BChl. *a* (B875) et en violet, les pigments présents dans le centre réactionnel.

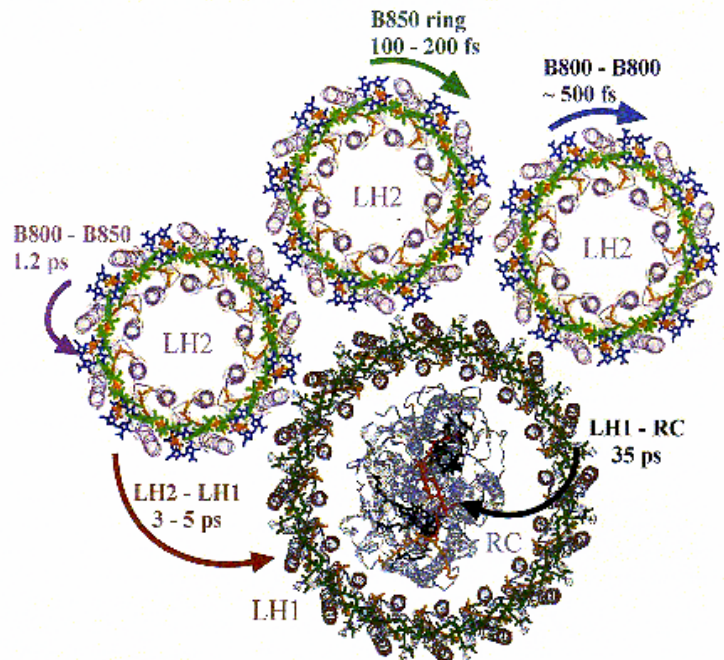


Figure I. 5: Les différentes étapes intervenant dans le transfert d'énergie au sein des unités photosynthétiques des bactéries pourpres, observées par photolyse laser flash. Les temps de transfert sont donnés à titre d'exemple chez la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodospseudomonas viridis*. D'après Cogdell & Gardiner (2001).

de bactériochlorophylles *a* absorbant à des longueurs d'ondes plus courtes que les bactériochlorophylles du complexe LH1, dont le maximum d'absorption varie en fonction de l'espèce considérée. Par exemple, chez la bactérie pourpre sulfureuse *Thiocapsa* 5811, le complexe LH2 absorbe à 820 nm (B820). L'énergie lumineuse est captée par les BChl. d'un complexe LH2 situé en périphérie, puis peut être transférée vers les BChl. de ce même complexe absorbant à des longueurs d'ondes plus élevées où elle est stockée plus ou moins longtemps (**figure I. 5**). Dès que le complexe LH1-RC se retrouve à proximité du complexe LH2, l'énergie stockée dans ce dernier est alors transférée vers le complexe LH1, puis vers le centre réactionnel où elle va être stockée pour finalement participer aux différents enchaînements des réactions photosynthétiques.

III. Écologie des bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses vertes et pourpres.

III.1. Photo-adaptation

Les bactéries sulfureuses vertes et pourpres, font l'objet depuis quelques années, de nombreuses études concernant les mécanismes développés en vue de leur adaptation à des variations d'intensité ou de qualité du régime lumineux. Aussi, il a été clairement mis en évidence que la composition pigmentaire des bactéries sulfureuses vertes et la teneur spécifique des bactéries sulfureuses pourpres varient en fonction du régime lumineux auquel les micro-organismes sont soumis lors de leur croissance (Borrego *et al.* 1995; Sanchez & Mas, 1999; Sanchez *et al.* 1998). Ces changements dans la composition pigmentaire, en réponse aux variations de lumière, sont réalisés i) par une variation du nombre d'unités photosynthétiques (centres réactionnels et complexes antennaires), ii) par une augmentation des pigments antennaires, iii) par les deux (Borrego *et al.* 1999; Lambersten Larsen *et al.* 1994). Par exemple, plus la bactérie sulfureuse verte *Chlorobium tepidum* est cultivée à faible intensité lumineuse, plus les teneurs spécifiques en BChl. *c* et en caroténoïdes augmentent. De même, lorsque ce micro-organisme est cultivé sous faible intensité lumineuse, la composition et la distribution des homologues de BChl. *c* les plus alkylés augmentent (Borrego *et al.* 1999). Cependant, les réponses aux variations du régime lumineux varient en fonction de chaque espèce. Par exemple, des Chlorobiaceae vertes et brunes, respectivement *Chlorobium limicola* et *Chlorobium phaeobacteroides*, cultivées à des régimes lumineux identiques,

répondent différemment à des variations d'intensité lumineuse. En effet, bien que les deux espèces réagissent toutes deux à une même diminution d'intensité lumineuse (de 50 à 1 $\mu\text{Ein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) par une augmentation de leur contenu pigmentaire spécifique, les Chlorobiaceae brunes restent les plus aptes à croître sous un régime lumineux critique atteignant de très faibles intensités (Borrego *et al.* 1995; Overmann *et al.* 1992). Chez *Prosthecochloris aestuarii*, dont la photo-adaptation sera notamment étudiée au chapitre IV de ce travail, une intensité lumineuse croissante entraîne une diminution consécutive du contenu pigmentaire spécifique, soit un rapport BChl. *c* / Car. quatre fois supérieur lorsque le micro-organisme est cultivé à des intensités lumineuses comprises entre 10 et 100 $\mu\text{Ein. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Guyonneaud *et al.* 2001).

Autres micro-organismes

Bon nombre d'organismes, outre les bactéries sulfureuses vertes et pourpres, sont adaptés aux variations du régime lumineux auquel ils sont soumis pour leur croissance. C'est notamment le cas de certaines espèces de cyanobactéries comme *Synechocystis* pour laquelle une forte augmentation de l'intensité lumineuse provoque une diminution de la teneur spécifique en caroténoïdes (Steiger *et al.* 1999). Pour *Synechococcus*, espèce marine unicellulaire représentant majeur de la communauté cyanobactérienne des océans, la photo-adaptation à la lumière bleue se traduit par l'augmentation du rapport phycourobiline / phycoerythrobiline (Palenik, 2001). Chez les diatomées telle que l'espèce marine *Skeletonema costatum*, c'est la composition en pigments majeurs : chlorophylle *a*, fucoxanthine, diadinoxanthine et diatoxanthine qui est affectée par un changement du régime lumineux. En effet, c'est à plus faible intensité lumineuse que les contenus en Chl. *a* et fucoxanthine sont supérieurs et les contenus en diadinoxanthine et diatoxanthine inférieurs (Anning *et al.* 2000). Par ailleurs, Aguilera *et al.* (1999) ont démontré que l'utilisation de fortes doses de radiations UV-A et UV-B sur l'algue rouge *Porphyra umbilicalis* entraîne une modification des pics d'absorption des pigments majeurs, à savoir une diminution de 65-67% des pics correspondant à la Chl. *a* et à la phycocyanine et de 75-82% pour les pics de caroténoïdes et de phycoérythrine .

III.2. Notion de pigments biomarqueurs

Que ce soit dans les systèmes pélagiques ou benthiques, les méthodes d'analyse des communautés bactériennes utilisent aujourd'hui différentes techniques. Il s'agit en fait de

retrouver des signes marqueurs propres à chaque communauté bactérienne, et d'étudier ces marqueurs ou proxies au sein du biofilm bactérien ou de la colonne d'eau. Parmi ces marqueurs, les marqueurs génétiques sont aujourd'hui parmi les plus utilisés (Casamayor *et al.* 1998, 2000a, 2001; Navarrete *et al.* 2000, Hartgers *et al.* 2000). Très récemment, des sondes spécifiques pour des séquences ADN des bactéries sulfureuses pourpres ont été mises au point afin de permettre la détection de ces organismes dans les environnements naturels (Achenbach *et al.* 2001). Parallèlement aux outils génétiques, les pigments qui sont un critère fort valable pour la distinction des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae (voir partie II), constituent eux aussi des biomarqueurs très fiables, dont l'utilisation a récemment subi une forte impulsion grâce à l'application de nouvelles méthodes chromatographiques. Les méthodes d'investigation et de localisation des individus sont alors d'autant plus simples si l'on sait que le pigment présent est spécifique à celui-ci. Il est ainsi commun d'utiliser les pigments biomarqueurs pour identifier les différents taxons bactériens retrouvés dans la colonne d'eau ou le sédiment. Par exemple, une trace de BChl. *c*, *d* ou *e* révélera la présence de bactéries vertes tandis qu'une trace d'okénone mettra en évidence la présence de bactéries sulfureuses pourpres. D'autres études ont confirmé l'utilité des pigments comme biomarqueurs de présence de bactéries sulfureuses dans les tapis microbiens. Pierson *et al.* (1987, 1990) ont analysé mm par mm la stratification des différentes communautés de bactéries phototrophes sulfureuses au sein de tapis microbiens des marais salants du Great Sippewissett (Mass., USA). On y a distingué deux couches de bactéries sulfureuses pourpres, l'une contenant la BChl. *a*, l'autre la BChl. *b*, comprises entre une couche de cyanobactéries en surface et une couche de bactéries sulfureuses vertes contenant la BChl. *c*, en profondeur. Il est important de souligner que certains pigments se conservent bien dans les systèmes sédimentaires. De ce fait, ils peuvent être utilisés pour la reconstitution des conditions environnementales (Guilizzoni *et al.* 1986; Bustillos-Guzmán *et al.* 2000). D'ailleurs, une étude réalisée sur des sédiments de la Mer Noire a révélé des traces d'isoréniératène, pigment spécifique des bactéries vertes sulfureuses brunes, conservées dans des sédiments datés de – 8200 ans (Repeta, 1993). Plus récemment, Chen *et al.* (2001) ont utilisé les pigments biomarqueurs des bactéries sulfureuses vertes afin d'analyser les cycles de périodes hypoxiques s'étant succédées au niveau de la plume du Mississippi (Louisiane, USA). Les fortes concentrations de BChl. *e* et son produit de dégradation la bacteriopheophytine *e*, pigments marqueurs de *Chlorobium phaeobacteroides* et *Chlorobium phaeovibrioides*, coïncident avec l'observation d'une augmentation de l'apport en nutriments sur les côtes de la

Louisiane au cours de ces 50 dernières années, confirmant que cet apport est à l'origine des cas d'hypoxie dans ce type d'écosystème.

III.3. Écologie en milieu benthique

III.3.1. Les tapis microbiens

Du fait de sa forte richesse en matière organique, l'interface eau-sédiment constitue une zone d'échanges importante où de nombreuses communautés bactériennes sont susceptibles de se développer. Parmi ces communautés bactériennes, les bactéries sulfureuses vertes et pourpres participent activement au cycle de la matière organique car elles utilisent pour la photosynthèse les produits de dégradation et de reminéralisation de la matière organique présents dans le milieu, tel que le soufre (Caumette, 1989; van den Ende & van Gemerden, 1994). De ce fait, on les qualifie de producteurs primaires secondaires ou producteurs pseudo-primaires (Pfennig, 1975). Les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae participent, associées à d'autres micro-organismes, à la formation de structures particulières appelées tapis microbiens, pouvant se développer dans des écosystèmes variés comme les lagunes hypersalées, les sources chaudes, les lacs... (van den Ende & van Gemerden, 1994; Stal, 1994). L'apparition et la mise en place de ces tapis microbiens sont soumises à diverses contraintes (Stal *et al.* 1985), parmi lesquelles on retrouve notamment des caractéristiques propres au sédiment comme la granulométrie, paramètre conditionnant la pénétration de la lumière. De plus, il existe des contraintes plus particulièrement liées à la dynamique du milieu comme la pression de sédimentation ou d'érosion et la lumière incidente, elle-même conditionnée par la profondeur de la colonne d'eau sus-jacente. Enfin, des contraintes d'ordre biologique sont liées à la présence dans le sédiment, d'organismes vivants participant à la bioturbation du système sédimentaire, pouvant entraîner une modification dans le schéma de stratification du tapis microbien (Goñi-Urriza *et al.* 1999). En fonction des exigences des micro-organismes, un schéma général de stratification des communautés bactériennes et des processus biogéochimiques mis en jeu, a été admis par de nombreux auteurs (Stal *et al.* 1985; de Wit & Caumette, 1994; van Gemerden, 1993; Stal & Caumette, 1993; de Wit *et al.* 1995). Ce schéma comprend, de la surface du sédiment vers la profondeur :

- Les cyanobactéries qui sont souvent à l'origine de la formation du tapis microbien (« mat-building organisms »).
- Les bactéries chimiotrophes sulfureuses parmi lesquelles se trouvent certaines Chromatiaceae (cf partie I.2.)

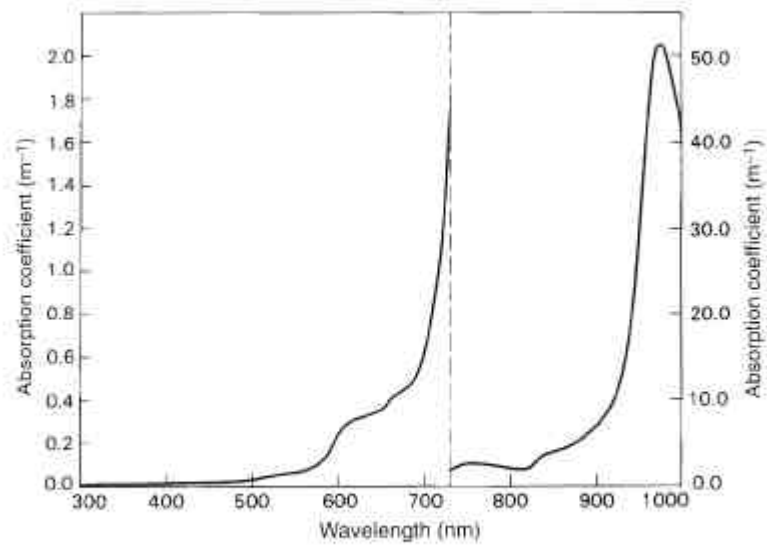


Figure I. 6: Spectre d'absorption de l'eau pure. D'après Kirk, 1994.

- Les bactéries phototrophes sulfureuses: les Chlorobiaceae, les Chromatiaceae et dans certains cas les Ectothiorhodospiraceae.
- Les bactéries sulfato-réductrices.

Au sein du compartiment benthique, les bactéries phototrophes sulfureuses sont localisées juste au niveau de la limite oxiq-anoxiq du sédiment de surface. Alors que les bactéries chimiotrophes sulfureuses et les bactéries phototrophes sulfureuses pourpres constituent les communautés les plus abondamment représentées au sein des tapis microbiens, les bactéries sulfureuses vertes n'y sont, quant à elles que très peu présentes (van Gemerden, 1993) ; une exception est cependant observée dans le marais salant de Sippewisset (Etats-Unis) où une couche distincte de bactéries sulfureuses vertes est directement observable à l'oeil nu (Pierson *et al.* 1987, 1990).

Le développement et la croissance des bactéries phototrophes sulfureuses au sein du compartiment benthique sont soumis aux variations des paramètres biotiques et physico-chimiques de l'environnement.

III.3.2. Influence de la lumière

La lumière représente sinon le paramètre majeur, l'un des paramètres physico-chimiques les plus importants conditionnant la distribution et l'activité des bactéries sulfureuses dans les systèmes sédimentaires (Caumette, 1989). La composition spectrale de la lumière qui pénètre dans le sédiment est directement fonction de la profondeur de la colonne d'eau sus-jacente. En effet, la colonne d'eau absorbe les longueurs les plus longues du spectre lumineux, notamment les infrarouges (IR) (**figure I. 6**). Ainsi, plus la profondeur de la colonne d'eau est importante, plus la quantité de rayons IR arrivant à la surface du sédiment est faible. Nous avons vu précédemment que la granulométrie est un facteur important contrôlant le développement des tapis microbiens (Kühl & Jorgensen, 1994). C'est aussi un paramètre majeur pour le développement des bactéries phototrophes sulfureuses, car de façon générale, la pénétration de la lumière dans le sédiment est directement fonction de sa granulométrie : Un sable fin est caractérisé par une forte attraction capillaire de l'eau interstitielle (Hoffman, 1942), et permet une pénétration importante des IR alors qu'un sédiment vaseux atténue beaucoup plus la lumière pénétrante (Guerrero *et al.* 1994). De plus, dans le sédiment, ce sont les longueurs d'ondes plus longues (>700 nm) qui pénètrent le plus profondément. Cela va donc entraîner une stratification des différents groupes de bactéries phototrophes sulfureuses dans le sédiment et avoir une influence prépondérante sur leur développement et leur croissance en fonction de leur besoin en qualité et quantité lumineuse.

D'une part, les Chromatiaceae, dont le pigment principal, la BChl. *a*, montre un maximum d'absorption *in vivo* à 800-890 nm (Imhoff, 1995), utilisent plutôt des longueurs d'ondes proches de l'IR et se localisent donc dans le sédiment de surface des milieux peu profonds où les IR sont encore présents. D'autre part, les Chlorobiaceae, qui ont un appareil photosynthétique dont l'ultrastructure couplant chlorosomes et centres réactionnels est des plus efficaces (voir partie II.2.1), sont mieux adaptées aux plus faibles intensités lumineuses.

Nous avons précédemment remarqué que les Chlorobiaceae sont capables de s'adapter à des variations de qualité et de quantité lumineuse. D'ailleurs, une étude réalisée sur trois cultures liquides de *Prosthecochloris aestuarii*, *Chlorobium phaeobacteroides* et *Chlorobium tepidum*, a déjà montré que chaque espèce montre un taux de croissance et un contenu pigmentaire variable en fonction de la qualité et de l'intensité lumineuse sous laquelle elles ont été cultivées (Massé, 1998). De même, une autre étude réalisée sur cette fois sur un biofilm expérimental de *Prosthecochloris aestuarii* a montré que l'activité photosynthétique, traduite par l'oxydation anoxygénique du sulfure est fonction du temps d'exposition à la lumière, et atteint une valeur maximale après 12 minutes d'exposition, avant de décroître au cours du temps. La phase de temps entre le début de l'exposition à la lumière et le maximum d'activité photosynthétique correspondrait alors à une phase de réorganisation des photopigments du micro-organisme (Pringault *et al.* 1999a).

III.3.3. Influence des composés soufrés

L'implication de la teneur en soufre et en composés soufrés du sédiment sur le développement et la croissance des bactéries phototrophes sulfureuses est indéniable. En effet, les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae sont les acteurs principaux du cycle du soufre au sein du compartiment sédimentaire. Le sulfure est fourni par les bactéries sulfato-réductrices depuis les couches profondes anoxiques vers les zones anoxiques du sédiment. Les bactéries sulfureuses interviennent dans ce cycle *via* des processus d'oxydation du sulfure, élément toxique, en soufre élémentaire puis en sulfate, participant ainsi à la détoxification du système. Le sulfure peut aussi directement diffuser vers la zone oxicque où il est oxydé en sulfate *via*, cette fois-ci les bactéries sulfureuses aérobies (Caumette, 1989).

La capacité d'utilisation des différents composés dérivés du soufre varie en fonction des espèces. D'une part, la majorité des Chromatiaceae sont des organismes dont le métabolisme versatile peut aisément passer de la photolithotrophie à la chimiotrophie (voir partie I.2). Ce sont des organismes capables d'utiliser des composés dérivés du soufre tels que le thiosulfate, le sulfite ou dans certains cas le diméthylsulfate (DMS) ou le

diméthylsulfonopropionate (DMSP) (Jonkers *et al.* 1998), et de stocker le soufre élémentaire sous forme de globules intracellulaires de réserve. Cette propriété leur confère un réel avantage puisque le soufre globulaire est utilisé comme donneur d'électrons lorsque le sulfure devient limitant (Guyoneaud, 1996). Le soufre peut aussi devenir l'accepteur d'électrons lors du catabolisme du glucose et du glycogène en acétate et CO₂ (de Wit, 1989). Bien que les tolérances en sulfure soient variables d'une espèce à l'autre, certaines espèces de Chromatiaceae peuvent entrer en compétition avec d'autres organismes sulfo-oxydants comme les bactéries sulfo-oxydantes incolores ou les Chlorobiaceae (voir ci après), pour les composés soufrés (Jørgensen & Des Marais, 1986).

Tout comme chez les Chromatiaceae, les tolérances en sulfure des Chlorobiaceae varient selon l'espèce considérée (Guyoneaud, 1996). Cependant, de par leur capacité à accumuler le soufre sous forme de globules extracellulaires, les Chlorobiaceae ont une meilleure affinité pour les sulfures, que les Chromatiaceae (van Gemerden, 1984). De plus, le sulfure étant le donneur d'électron principal pour la chaîne de réactions photosynthétiques des bactéries sulfureuses vertes (voir partie I.1), sa présence dans le milieu reste le paramètre indispensable à leur croissance. Chez *Prosthecochloris aestuarii* cultivé en sédiment artificiel (Pringault *et al.* 1999a), l'activité photosynthétique, après avoir atteint un maximum, diminue de façon simultanée avec la diminution du sulfure dans le milieu, indiquant que cet élément peut constituer un facteur limitant pour la photosynthèse.

III.3.4. Influence de l'oxygène

Chez les bactéries phototrophes sulfureuses anoxygéniques, l'oxygène est à la fois l'accepteur terminal pour la chimiosynthèse et un inhibiteur de la synthèse de photopigments telle que la bactériochlorophylle, nécessaire aux processus photosynthétiques. Les relations entre les différents organismes et ce composé varient en fonction de l'espèce considérée. Certaines espèces de Chromatiaceae peuvent tolérer l'oxygène et passer d'un métabolisme phototrophe vers un métabolisme chimiotrophe. Leur présence dans les couches sédimentaires de surface épuise l'oxygène dont la pénétration dans les couches profondes est alors diminuée (Overmann & Pfennig, 1992). Dans les tapis microbiens, les bactéries sulfureuses pourpres sont souvent exposées aux alternations oxiques (jour) / anoxiques (nuit). La souche bactérienne *Thiocapsa roseopersicina* paraît parfaitement adaptée à ces conditions. Ainsi chez cette bactérie, la présence d'oxygène en période lumineuse inhibe la synthèse pigmentaire. Cependant, lors de périodes d'obscurité combinées à des conditions anoxiques, on s'est aperçu que la synthèse pigmentaire est fortement augmentée. De ce fait, l'organisme conserve

sa teneur pigmentaire et maintient ses systèmes photosynthétiques. Quoique les teneurs pigmentaires fluctuent lors des cycles oxiques / anoxiques, *Thiocapsa roseopersicina* peut croître par photosynthèse pendant les périodes lumineuses, optimisant son taux de croissance qui devient nettement supérieur à celui observé lorsque seule la chimiosynthèse est possible (de Wit, 2000).

Les Chlorobiaceae sont des micro-organismes anaérobies strictes (voir partie I.1). De ce fait, ils ne tolèrent pas la présence d'oxygène, élément toxique pour leur croissance, et sont donc exclusivement localisés au niveau de la zone anoxique du sédiment, sous la limite oxique-anoxique. Aussi, Il a été récemment démontré que chez *Chlorobium tepidum*, la présence d'oxygène réprime la BChl. *c* antennaire, découplant ainsi l'absorption de la lumière par le chlorosome et le transfert d'électrons, ce qui finalement inhibe les réactions photosynthétiques (Frigaard & Matsuura, 1999).

III.3.5. Influence de la température

La température constitue l'un des paramètres physiques déterminant pour la présence et l'abondance de certaines espèces de bactéries phototrophes sulfureuses, dans les écosystèmes lagunaires ou les tapis microbiens. Ward *et al.* (1989) ont démontré que la plupart des tapis anoxygéniques où se développent les bactéries phototrophes sulfureuses, sont très souvent localisés au niveau de sources chaudes, et peuplés de bactéries sulfureuses capables de tolérer de fortes températures. Parmi ces micro-organismes thermotolérants, on retrouve les bactéries sulfureuses pourpres du genre *Chromatium*, les bactéries vertes filamenteuses de genre *Chloroflexus* et les Chlorobiaceae du genre *Chlorobium*. Ce dernier se développe au niveau d'un tapis microbien dans une source chaude de Nouvelle Zélande, sur une épaisseur de 0.5 à 3.0 mm, à une température de 50°C (Castenholz *et al.* 1990). Dans certains cas, les tapis microbiens se forment dans des environnements particuliers comme les sources hydrothermales caractérisées par de fortes concentrations ferriques (Pierson & Parenteau, 2000). Là encore, la température joue un rôle essentiel dans la dominance des espèces : entre 36 et 45°C, la communauté bactérienne est dominée par une espèce de cyanobactérie (*Oscillatoria*) alors que pour des températures comprises entre 48 et 54°C, on retrouve la coexistence de deux populations bactériennes différentes (*Synechococcus* et *Chloroflexus* ou *Pseudanabaena* et *Mastigocladus*) dont les métabolismes sont couplés.

Il est néanmoins fréquent de retrouver des tapis microbiens dans des environnements plus émergés tels que les écosystèmes lagunaires où cette fois-ci, ce n'est plus la température mais bien la lumière qui devient un paramètre déterminant puisque la pénétration lumineuse

constitue le facteur clé. Dans ce type de système, on remarque souvent la dominance de la bactérie sulfureuse pourpre *Thiocapsa*. C'est par exemple le cas de lagunes telles que le Bassin d'Arcachon (France) et l'Etang du Prévost (France) où des études menées ces dix dernières années ont permis de mettre en évidence l'abondance de bactéries du genre *Thiocapsa* associées à des bactéries sulfureuses vertes et des bactéries pourpres non sulfureuses, dans des sédiments côtiers (Caumette *et al.* 1994; Guyoneaud *et al.* 1996; Guyoneaud, 1996; Schaub *et al.* 1996).

III.3.6. Autres paramètres

Le pH n'influence que très peu la distribution des communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses dans les systèmes sédimentaires. Cependant, alors que les Chromatiaceae peuvent supporter des pH de l'ordre de 8, la plupart des Chlorobiaceae ne supportent que de très faibles variations de pH plus neutres (6.8-6.9).

La salinité est un paramètre physico-chimique pouvant influencer le développement des tapis microbiens. Tandis que très peu d'études ont été réalisées sur l'effet de la salinité sur la croissance des Chlorobiaceae, certaines Chromatiaceae du genre *Chromatium* sont quant à elles capables de se développer dans des environnements hypersalés, comme les marais salants (Caumette *et al.* 1999), selon un mode de croissance photo-organotrophe en utilisant le glycolate ou le glycerol (Caumette *et al.* 1997).

III.4. Écologie en milieu pélagique

La photosynthèse anoxygénique peut représenter jusqu'à 90% du CO₂ total fixé dans les lacs (Biebl & Pfennig, 1979). Aussi, d'importantes populations de bactéries phototrophes sulfureuses vertes et pourpres peuvent se développer dans les environnements pélagiques, tels que les lacs stratifiés ou les lagunes, où elles forment parfois de véritables « couches » (ang. « plates ») dans la colonne d'eau (Caumette, 1989; Overmann *et al.* 1991, Guerrero & Mas, 1989). Ceci n'est cependant possible que lorsque les deux éléments essentiels à la croissance des bactéries sulfureuses, sulfure et lumière, sont présents et disponibles pour la photosynthèse. La distribution des bactéries phototrophes sulfureuses dans les systèmes pélagiques se réalise selon une échelle différente en fonction de l'écosystème considéré : du décimètre au mètre dans les lacs ou de 10 mètres à 100 mètres dans les mers fermées. Dans cet exposé traitant de l'écologie des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae en milieu pélagique,

nous étudierons essentiellement le cas des lacs stratifiés où la distribution des communautés bactériennes au sein de la colonne d'eau rappelle celle observée en milieu benthique : les bactéries phototrophes sulfureuses pourpres sont situées juste au-dessus des vertes. Les deux communautés se développent sous forme planctonique à la limite oxique-anoxique des eaux, entre le phytoplancton de surface et les bactéries sulfato-réductrices en profondeur (de Wit, 2000). Dans le cas des lacs stratifiés méromictiques, cette distribution verticale est fortement influencée par la stratification dont la mise en place est accompagnée par de forts gradients de température, de pénétration de lumière, de sulfure et d'oxygène (Rodrigo *et al.* 1999)

Parmi les bactéries sulfureuses les plus fréquemment isolées à partir des eaux anoxiques des lacs stratifiés, on retrouve plusieurs genres de Chromatiaceae tels que *Amoebobacter* (Eichler & Pfeñnig, 1986, 1988), *Chromatium* ou *Thiocapsa*, mais aussi des Chlorobiaceae du genre *Chlorobium* (Overmann *et al.* 1999, Casamayor *et al.* 2000a, 2000b; Bosshard *et al.* 2000).

III.4.1. Influence de la lumière

La lumière représente le paramètre majeur conditionnant la distribution et la croissance des bactéries sulfureuses vertes et pourpres dans les systèmes pélagiques. D'une part, le régime lumineux varie en fonction de la saison ; en été, les radiations solaires sont importantes, l'intensité lumineuse élevée et la pénétration de la lumière peut atteindre les couches plus profondes. Au contraire, en hiver, la période lumineuse est raccourcie et l'intensité plus faible. La pénétration lumineuse dans les couches les plus profondes dépend de la turbidité. En effet, dans les écosystèmes pélagiques, la lumière qui atteint la surface a été absorbée à la fois par l'eau, les substances dissoutes et en suspension, et par les organismes photosynthétiques ou non. En d'autres termes, le régime lumineux est corrélé à la fois à la saison, à la profondeur de la colonne d'eau et à l'abondance des organismes phytoplanctoniques qui se développent en surface (Pedrós-Alió *et al.* 1983). De ce fait, la répartition, la distribution et l'activité photosynthétique des organismes phototrophes anoxygéniques vont être fortement conditionnées par ces variations. Grâce à leur possibilité de photo-adaptation (voir partie III.1), les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae sont capables de survivre au sein des écosystèmes les moins stables. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la lumière sur la composition et la distribution des bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses vertes et pourpres dans les systèmes pélagiques. Dans certains lacs notamment, on observe une modification des assemblages bactériens en fonction des variations saisonnières du régime lumineux (Borrego *et al.* 1993; Montesinos, 1983; Vila &

Abella, 1993, 1994, 1998; Vila *et al.* 1996). Parfois, certaines espèces sont capables de se déplacer dans la colonne d'eau afin de rejoindre des conditions optimales pour leur survie et leur croissance en s'adaptant aux variations journalières de la lumière, et des concentrations en sulfure. *Chromatium weissii* constitue la population dominante de l'hypolimnion anoxique d'un lac stratifié (Arcas, Espagne) où elle coexiste avec deux autres espèces de Chromatiaceae, *Thiocapsa* sp. et *Amoebobacter* sp., juste au dessus d'une population de Chlorobiaceae représentée par le genre *Pelodictyon* (Rodrigo *et al.* 1999). Durant le jour, la population de *Chromatium weissii* est constituée d'une fine couche de cellules qui, petit à petit, migre en profondeur et devient beaucoup plus épaisse à la tombée de la nuit, dispersée au niveau de l'hypolimnion. Dans ce cas, les migrations verticales des cellules bactériennes peuvent atteindre 40 cm en 8 heures.

III.4.2. Influence des composés soufrés

Les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae oxydent le sulfure issu de la réduction du sulfate réalisée soit dans le sédiment, soit dans l'hypolimnion sous-jacent par les bactéries sulfato-réductrices. Aussi, pour la photosynthèse anoxygénique, la disponibilité des composés soufrés comme le sulfure, le soufre élémentaire et les polysulfures, est directement corrélée aux périodes de stratification. Au début de la période estivale et de l'élévation de température, la concentration en sulfure diminue. Afin de pallier à cette diminution et de pouvoir maintenir leur activité photosynthétique, toutes les espèces de Chromatiaceae utilisent le soufre accumulé sous forme de globules intracellulaires comme donneur d'électrons pour la photosynthèse (Overmann *et al.* 1994, Overmann *et al.* 1996).

III.4.3. Influence de la salinité

Dans certains cas de lacs méromictiques, la salinité influence la structure, la dynamique et la distribution verticale des bactéries sulfureuses vertes et pourpres. Lors des périodes de stratification, les conditions anoxiques favorables au développement des Chlorobiaceae et les Chromatiaceae, migrent vers les eaux douces de surface. Une nouvelle structure des populations de bactéries sulfureuses vertes et pourpres se met en place juste en dessous de la limite oxiq-anoxique des eaux. La distribution des populations s'effectue ensuite en fonction de leur tolérance à la salinité et de leurs exigences en lumière (bactéries pourpres en surface et vertes en profondeur). Une première communauté présente dans les eaux douces de surface, comprend les populations de bactéries sulfureuses vertes et pourpres

tolérant de faibles salinités. Au contraire plus en profondeur, des populations tolérant une salinité plus élevée se développent juste sous l'halocline (Garcia-Gil *et al.*, 1999).

III.4.4. Rôle au sein des réseaux trophiques

Du fait de leur rôle prépondérant dans le cycle de dégradation de la matière organique, les Chlorobiaceae et des Chromatiaceae font partie du premier maillon de la chaîne trophique. De plus, ces organismes peuvent directement constituer une source de nourriture potentielle pour certains organismes zooplanctoniques. En effet, certaines espèces de Chromatiaceae (*Amoebobacter purpureus*) peuvent représenter une source potentielle de nourriture pour certains invertébrés planctoniques tels que les copépodes *Acartia clausi* et *Tisbe* sp. (Caumette, 1987; Overmann *et al.* 1999).

III.4.5. Cas particulier des eaux rouges bactériennes.

Les eaux rouges bactériennes ou malaïgues sont des phénomènes fréquemment rencontrés en période estivale dans les systèmes confinés tels que les lagunes ou les marais du pourtour méditerranéen. Les eaux rouges doivent leur nom à la prolifération massive de bactéries sulfureuses pourpres de genre *Chromatium*, *Thiocystis* et surtout *Thiocapsa* dont l'espèce *Thiocapsa roseopersicina* est souvent la plus abondante (Caumette & Baleux, 1980). Ces événements sont la suite logique d'une série de phénomènes ayant lieu au moment où l'éclairement solaire important s'accompagne d'une nette élévation de la température, de l'air, de l'eau et, d'une diminution du brassage de la colonne d'eau par les vents. Lorsque ces conditions sont réunies et souvent couplées à l'augmentation des apports en éléments minéraux par les bassins versants, on observe le développement et la croissance d'algues vertes phototrophes à la surface des étangs et des lagunes. Ces dernières vont très rapidement proliférer à la surface de l'eau pour finalement totalement la recouvrir. En été, la température et le manque de brassage des eaux entraînent la mort des algues. La dégradation intense de la matière végétale provoque la disparition de l'oxygène dans la colonne d'eau et la formation d'une zone anoxique provoquant ainsi la mort de la faune présente (poissons, crevettes...). Petit à petit, la matière organique issue de la décomposition des algues migre vers le fond pour se déposer et s'accumuler à la surface du sédiment. L'accumulation de cette matière organique à l'interface eau-sédiment provoque une augmentation de l'activité des bactéries hétérotrophes anaérobies et notamment les bactéries sulfato-réductrices dans les couches les plus profondes du compartiment benthique qui la transforme en sulfure. Ce composé peut alors diffuser directement vers la colonne d'eau et rejoindre les couches atmosphériques, ou

bien stagner sous forme de composé toxique dans la colonne d'eau. C'est à ce stade qu'interviennent les bactéries sulfureuses vertes et pourpres dont *Thiocapsa roseopersicina*. En effet, la colonne d'eau étant devenue totalement anoxique, les bactéries phototrophes anoxygéniques trouvent ici le sulfure nécessaire pour réaliser leur photosynthèse et se multiplier en oxydant le sulfure toxique en sulfate. La couleur rouge-rosée de *Thiocapsa roseopersicina* apparaît alors sur toute la surface de la colonne d'eau. Finalement, à la fin de la période estivale, la diminution de température couplée à une augmentation du brassage des eaux de surface par le vent, permet à nouveau le rétablissement des conditions oxiques dans la colonne d'eau ; la biomasse des bactéries sulfureuses pourpres diminue, permettant à l'écosystème de rétablir son état d'équilibre. Il est important de remarquer que l'apparition des eaux rouges dans les systèmes confinés a une influence considérable sur l'écologie du milieu puisque chaque année, on dénombre une mort consécutive de la faune mais aussi une fuite des animaux sédentaires. Bien que diverses solutions aient été étudiées afin d'éviter ces crises à la fois en aval (réduction des rejets d'éléments minéraux) et en amont (filet, ramassage des algues), aucune d'entre elles ne s'est révélée, à ce jour, réellement efficace (Guyoneaud *et al.* 1998).

III.5. Interactions entre bactéries sulfureuses vertes et pourpres

L'étude des interactions et des phénomènes de compétition entre les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae dans les systèmes naturels, n'est possible que lorsque les conditions environnementales (concentrations en sulfure et régime lumineux) sont optimales (Abella *et al.* 1980).

III.5.1. Compartiment benthique

Afin de mieux connaître l'écologie et l'évolution des communautés de bactéries sulfureuses, il est nécessaire de déterminer les interactions possibles entre ces différentes communautés (Overmann & van Gemerden, 2000). Comme nous l'avons vu précédemment, les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae forment des communautés bactériennes très abondantes dans les systèmes sédimentaires et plus particulièrement les tapis microbiens. Au sein de ces écosystèmes, les populations sont en compétition à la fois pour la lumière, unique source d'énergie, mais aussi pour le sulfure, principal donneur d'électrons pour la photosynthèse anoxygénique (van Gemerden, 1987). Aussi, de nombreuses études ont été

menées sur la stratification et la distribution verticale des communautés de bactéries sulfureuses vertes et pourpres dans les tapis microbiens. Ainsi, Pierson *et al.* (1987, 1990) ont observé une stratification des communautés bactériennes du marais salant de Sippewissett (Etats-Unis) en accord avec la stratification théorique des tapis microbiens. On en a finalement statué qu'au sein des tapis microbiens, les bactéries pourpres, de par leur capacité à croître par chimiotrophie, se localisent près de la surface et les bactéries vertes, anaérobies strictes, se situent dans les couches les plus profondes du sédiment, en dessous de la profondeur maximale de pénétration de l'oxygène. Ce schéma de stratification verticale a été récemment étudié dans un tapis microbien artificiel. L'étude a révélé une couche caractérisée par la coexistence de bactéries sulfureuses vertes et pourpres à la même profondeur dans le sédiment (Fenchel & Kühl, 2000 ; Kühl & Fenchel, 2000). De même, une étude menée sur des biofilms expérimentaux obtenus dans un système de culture simulant les conditions environnementales du milieu naturel (gradients de lumière, sulfure et pH) a mis en évidence une possible coexistence de bactéries sulfureuses pourpres et vertes, respectivement *Thiocapsa roseopersicina* et *Prosthecochloris aestuarii* (Pringault *et al.* 1999b). Le biofilm était divisé en deux parties. La première partie située juste sous la surface, dans la zone oxygène du sédiment, était constituée d'une unique population de *Thiocapsa roseopersicina* à métabolisme chimiotrophe. Dans la seconde partie, totalement anoxique du biofilm, *Thiocapsa roseopersicina* coexistait avec *Prosthecochloris aestuarii*, strictement anaérobie, sous la profondeur maximale de pénétration de l'oxygène. L'utilisation de l'oxygène en surface par la première population de *Thiocapsa roseopersicina* diminue la profondeur de pénétration de l'oxygène. De ce fait, *Prosthecochloris aestuarii* dont le métabolisme est strictement phototrophe peut se localiser plus proche de la surface et profiter de plus fortes intensités lumineuses pour ses processus photosynthétiques. D'autre part, le soufre extracellulaire accumulé chez *Prosthecochloris aestuarii* peut réagir abiotiquement pour former des polysulfures potentiellement utilisables par *Thiocapsa roseopersicina*.

III.5.2. Compartiment pélagique

Les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae sont localisées sous forme planctonique au niveau de la zone oxygène-anoxique des écosystèmes pélagiques. Dans le cas des lacs, ces populations bactériennes prolifèrent dès l'établissement de la stratification des eaux et lorsque le sulfure formé au niveau de l'hypolimnion sous jacent, est en quantité suffisante. Différentes études ont montré que les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae coexistent dans la colonne d'eau, même lorsque les concentrations en sulfure sont limitantes (van Gemerden, 1987). En

réalité, les phénomènes de compétition pour les composés soufrés entre Chlorobiaceae et Chlorobiaceae au sein de la colonne d'eau sont restreints. En opposition à ce qui a été démontré pour les cultures en continu (van Gemerden, 1984; van Gemerden & Beefink, 1981), les Chromatiaceae du genre *Thiocapsa* sont capables de croître même si les concentrations en composés réduits sont faibles. En milieu naturel, *Thiocapsa* s'adapte plus facilement à des concentrations limitantes, que les Chlorobiaceae du genre *Chlorobium* (Eckert *et al.* 1986). D'autre part, la relation avec la lumière est différente pour chaque communauté. En effet, les bactéries sulfureuses pourpres nécessitent des intensités lumineuses relativement fortes et couvrant un large spectre lumineux. A l'opposé, les Chlorobiaceae sont capables de s'adapter à des intensités lumineuses beaucoup plus faibles et d'utiliser des fenêtres de longueurs d'ondes beaucoup plus restreintes. *Thiocapsa roseopersicina* montre une activité photosynthétique et une croissance maximale pour des intensités de 50 à 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ alors que des intensités de 10 à 25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ sont préférables pour *Chlorobium phaeobacteroides* (Eckert *et al.* 1986). De ce fait, bien que les deux communautés coexistent tout au long de l'année, des blooms spécifiques se forment de façon complémentaire. Alors que les Chlorobiaceae sont les plus abondantes de l'hiver jusqu'à la fin du printemps, les Chromatiaceae se concentrent à la surface au début de l'été et prolifèrent grâce à l'augmentation de l'intensité lumineuse. Dans certains cas, le bloom agit alors comme un filtre pour les rayons lumineux qui parviennent ensuite aux populations de Chlorobiaceae sous jacentes. Les Chlorobiaceae s'adaptent alors à ces nouvelles conditions lumineuses en modifiant leur contenu pigmentaire (Abella *et al.* 1980).

IV. Présentation du travail

La distribution des bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses est aujourd'hui bien connue à la fois dans le compartiment pélagique et le compartiment benthique.

De plus, le rôle de la qualité lumineuse sur cette répartition a été mis en évidence à plusieurs reprises pour la colonne d'eau. Il a ainsi été démontré que les Chlorobiaceae sont notamment capables d'adapter leur contenu pigmentaire en fonction du régime lumineux auxquelles elles sont soumises. Pour cela, elles ont développé des formes moléculaires particulières de leur pigment majeur, la Bactériorhodospirine *c*, *d* ou *e*.

En milieu benthique naturel, c'est grâce à l'émergence de nouvelles techniques, que l'on a pu étudier le compartiment sédimentaire et y analyser les différentes communautés présentes. Ainsi, grâce au développement de nouveaux proxies bactériens pigmentaires ou moléculaires, on est désormais capable de localiser de façon de plus en plus précise, les différentes espèces bactériennes présentes dans le sédiment. Cela est sans compter avec la mise au point de nouvelles techniques de mesures à partir des microélectrodes et microsondes. En effet, on a aujourd'hui la possibilité d'étudier, à des échelles très fines (de l'ordre du micromètre) les différents processus biogéochimiques sédimentaires.

Toutefois, pendant de très nombreuses années, seules les cultures liquides permettaient l'étude de ces processus. Aujourd'hui, la mise au point de nouvelles techniques de culture en sédiment artificiel, permet d'obtenir des biofilms bactériens tout en contrôlant les paramètres physicochimiques du milieu. Alors que l'on a longtemps pensé que les communautés de bactéries sulfureuses vertes et pourpres étaient strictement stratifiées dans le sédiment, on a pu à l'aide de ce mode de culture simulant des conditions les plus proches des conditions environnementales, mettre en évidence la coexistence au sein d'une même profondeur et les interactions existant entre ces deux communautés.

Dans ce travail, nous nous proposons d'utiliser cette nouvelle technique de culture en sédiment artificiel afin d'étudier, tout comme cela a été fait en milieu pélagique, l'impact de la qualité lumineuse sur le développement et la croissance des bactéries sulfureuse vertes, représentées par *Prosthecochloris aestuarii*. Dans un second temps, ces mêmes conditions lumineuses seront testées sur la croissance de *P. aestuarii*, cultivé en culture mixte avec la bactérie pourpre *Thiocapsa roseopersicina*. Ces deux travaux seront présentés aux chapitre III de cette thèse.

Enfin, le chapitre IV de cette thèse sera consacré à l'étude de l'adaptation pigmentaire en milieu pélagique, des bactéries sulfureuses vertes *Prosthecochloris aestuarii* et *Chlorobium phaeobacteroides*, cultivées en lumière verte, à différentes intensités lumineuses, simulant les conditions lumineuses à différentes profondeurs de la colonne d'eau.

Références bibliographiques

Abella, C., Montesinos E. & Guerrero R. 1980. Field studies on the competition between purple and green sulfur bacteria for available light (Lake Siso, Spain), p. 173-181. *In*,

- M. Dokulil, H. Metz and D. Jewson (eds). Developments in Hydrobiology, vol. 3. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague.
- Achenbach, L. A., Carey J. & Madigan M.T. 2001. Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 2922-2926.
- Aguilera, J. Jiménez C., Figueroa F.L., Lebert M. & Häder D.P. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48**: 75-82.
- Airs, R. Borrego C.M., Garcia-Gil J. & Keely B.J. Identification of the bacteriochlorophyll homologues of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6053 grown at light limitation. *Photosynth. Res.* In press.
- Anning, T., MacIntyre H.L., Pratt S.M., Sammes P.J., Gibb S. & Geider R. 2000. Photoacclimatation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* **45**(8): 1807-1817.
- Biebl, H. & Pfennig N. 1979. Anaerobic CO₂ uptake by phototrophic bacteria. A review. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.* **12**: 48-58.
- Blankenship, R.E., Olson J.M., & Miller M. 1995. Antenna complexes from green photosynthetic bacteria, p. 399-435. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Borrego, C.M., Arellano J.B., Abella C.A., Gillbro T., & Garcia-Gil J. 1999. The molar extinction coefficient of bacteriochlorophyll *e* and the pigment stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides*. *Photosynth. Res.* **60**: 257-264.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Cristina X.P., Vila X., & Abella C.M. 1998. Occurrence of a new bacteriochlorophyll *d* forms in natural populations of green photosynthetic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 257-267.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Vila X., Cristina X.P., Figueras J.B. & Abella C.M. 1997. Distribution of bacteriochlorophyll homologs in natural populations of brown-colored phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 301-309.
- Borrego, C.M. 1996. Heterogeneitat pigmentària en els bacteris fotosintètics verds. *Fisiologia i significació ecològica*. Tesi Doctoral, Universitat de Girona, 211 p.
- Borrego, C.M. & Garcia-Gil J. 1995. Rearrangement of light harvesting bacteriochlorophyll homologues as a response of green sulfur bacteria to low light intensities. *Photosynth. Res.* **45**: 21-30.

- Borrego, C.M. & Garcia-Gil J. 1994. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth. Res.* **41**: 157-163.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Bañeras L. & Brunet R.C. 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of Lake Banyoles (Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 720-725.
- Bosshard, P.P., Santini Y., Grüter D., Stettler R. & Bachofen R. 2000. Bacterial diversity and community in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 173-182.
- Bustillos-Guzmán, J., López-Cortés D. Hernandez F. & Murillo I. 2000. Pigment signatures associated with an anoxic coastal zone: Bahia Concepcion, Gulf of California. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **249**: 77-88.
- Casamayor, E. O., Muyzer G. & Pedrós-Alió C. 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **25**: 237-246.
- Casamayor, E. O., Núñez-Cardona M.T., Calderón-Paz J.I., Mas J. & Pedrós-Alió C. 2000 (a). Comparison of pure cultures and natural assemblages of planktonic photosynthetic sulfur bacteria by low molecular mass RNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 25-34.
- Casamayor, E.O., Schäfer H., Bañeras L., Pedrós-Alió C. & Muyzer G. 2000 (b). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from two Neighboring Sulfurous Lakes : Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 499-508.
- Casamayor, E. O., Calderón-Paz J.I. , Mas J. & Pedrós-Alió C. 1998. Identification of phototrophic sulfur bacteria through the analysis of ImwRNA band patterns. *Arch. Microbiol.* **170**: 269-278.
- Castenholz, R.W., Bauld J. & Jørgensen B.B. 1990. Anoxygenic microbial mats of hot springs :thermophilic *Chlorobium* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 325-336.
- Caumette, P., Matheron R, Welsh D.T., Herbert R.A. & de Wit R. 1999. Ecology and osmoadaptation of halophilic Chromatiaceae in hypersaline environments, p. 707-713. *In*, Peschek *et al.* (eds), *The Phototrophic Prokaryotes : Proceedings of the Ninth Symposium on Phototrophic Prokaryotes*, Vienna, 1997. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

- Caumette, P., Imhoff J.F., Süling J. & Matheron R. 1997. *Chromatium glycolicum* sp. nov., a moderately halophilic purple bacterium that uses glycolate as substrate. *Arch. Microbiol.* **167**: 11-18.
- Caumette, P., Matheron R., Raymond N. & Relexans J.C. 1994. Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Giraud, France). *FEMS Microb. Ecol.* **13**: 273-286.
- Caumette, P. 1989. Ecology and General Physiology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria in Benthic Environments, p. 283-304. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), *Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- Caumette, P. 1987. Rôle des bactéries phototrophes et des bactéries sulfato-réductrices dans les milieux lagunaires. Thèse. Editions de l'Orstom, collection Etudes et Thèses, Paris. 304p.
- Caumette, P. & Baleux B. 1980. Etude des eaux rouges dues à la prolifération des bactéries photosynthétiques sulfo-oxydantes dans l'Étang du Prévost, lagune saumâtre méditerranéenne. *Marine Biology* **56**: 183-194.
- Chen, N., Bianchi T.S., McKee B.A. & Bland J.M. 2001. Historical trends of hypoxia on the Louisiana shelf: application of pigments as biomarkers. *Organic Geochemistry* **32**: 543-561.
- Cogdell, R. & Gardiner A.T. 2001. Light harvesting by purple bacteria: a circular argument. *Microbiology Today* **28**: 120-122.
- de Wit, R. 2000. Sulfide-Containing Environments, p. 478-493. *In* *Encyclopedia of Microbiology*, volume 4, second edition; Academic Press.
- de Wit, R., van den Ende F.P. & van Gemerden H. 1995. Mathematical simulation of the interactions among cyanobacteria, purple sulfur bacteria and chemotrophic sulfur bacteria in microbial mats communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 117-136.
- de Wit, R. & Caumette P. 1994. Diversity of and interactions among sulphur bacteria in microbial mats, p.377-392. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- de Wit, R. 1989. Interactions between phototrophic bacteria in marine sediments. Ph. D Thesis. University of Groningen. 143p.

- Eckert, W., Frevert T., Bergstein-Ben Dan T. & Cavari B.Z. 1986. Competitive development of *Thiocapsa roseopersicina* and *Chlorobium phaeobacteroides* in Lake Kinneret. *Can. J. Microbiol.* **32**: 917-921.
- Eichler, B. & Pfennig, N. 1988. A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter purpureus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **149**: 395-400.
- Eichler, B. & Pfennig N. 1986. Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pedioformis* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**: 295-300.
- Fenchel, T. & Kühl M. 2000. Artificial Cyanobacterial Mats : Growth, Structure, and Vertical Zonation Patterns. *Microb. Ecol.* **40**: 85-93.
- Frigaard, N-U. & Matsuura K. 1999. Oxygen uncouples light absorption by the chlorosome antenna and photosynthetic electron transfer in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1412**: 108-117.
- Frigaard, N-U. 1997. Light-harvesting Structures in Green Sulfur Bacteria, Ph.D. thesis, Odense University, Odense, Denmark.
- Garcia-Gil, L.J., Vicente E., Camacho A., Borrego C.M., Vila X., Cristina X.P. & Rodriguez-Gonzalez J. 1999. Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in Lake 'El Tobar' (Cuenca, Spain). *Aquat. Microb. Ecol.* **20**: 299-303.
- Gregory, R.P.F. 1989. *Biochemistry of Photosynthesis*, Third edition. John Wiley and sons (eds.). Bath Press, Great Britain, 257 p.
- Goni-Urriza, M., de Montaudouin X., Guyoneaud R. Bachelet G. & de Wit R. 1999. Effect of macrofaunal bioturbation on bacterial distribution in marine sandy sediments, with special reference to sulphur-oxidising bacteria. *Journal of Sea Research* **41**: 269-279.
- Guerrero, M. C., Tadeo A.B. & de Wit R. 1994. Environmental factors controlling the development of microbial mats in inland saline lakes; the granulometric composition of the sediment, p. 85-90. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- Guerrero, R. & Mas J. 1989. Multilayered Microbial Communities in Aquatic Ecosystems : Growth and Loss Factors, p. 37-49. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), *Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society for Microbiology, Washington, D C.

- Guilizzoni, P., Lami A., Ruggiu D. & Bonomi G. 1986. Stratigraphy of specific algal and bacterial carotenoids in the sediments of Lake Varese (N. Italy). *Hydrobiologia* **143**: 321-325.
- Guyoneaud, R., Borrego C., Martínez-Planells A., Buitenhuis E.T. & Garcia-Gil L.J. 2001. Light responses in the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*: changes in prothecae length, ultrastructure, and antenna pigment composition. *Arch. Microbiol.* **176**: 278-284.
- Guyoneaud, R. 1996. Étude écologique, physiologique et systématique des communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques en milieu lagunaire méditerranéen et atlantique. Thèse Université de Bordeaux 1 (n° 1387), 225 p.
- Guyoneaud, R., de Wit R., Matheron R. & Caumette P. 1998. Impact of macroalgal dredging on dystrophic crises and phototrophic bacterial blooms (red waters) in a brackish coastal lagoon. *Oceanologica Acta* **21**(4).
- Guyoneaud, R., Matheron R., Baulaigue R., Podeur K., Hirschler A. & Caumette P. 1996. Anoxygenic phototrophic bacteria in eutrophic coastal lagoons of the French Mediterranean and Atlantic Coasts (Prévost Lagoon, Arcachon Bay, Certes Fishponds). *Hydrobiologia* **329**: 33-43.
- Hartgers, W A, Schouten S., Lopez, J F, Sinninghe Damsté, J S & Grimalt, J.O. 2000. ¹³C-contents of sedimentary bacterial lipids in a shallow sulfidic monomictic lake (Lake Ciso, Spain). *Organic Geochemistry* **31**: 777-786.
- Hoffmann, C. 1942. Beiträge zur Vegetation des Farbstreifen-Sandwatt. *Kieler Meeresforsch* **4**: 85-108.
- Imhoff, J. F. 1995. Taxonomy and Physiology of phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria, p. 1-15. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Jonkers, H. M., de Bruin S. & van Gemerden H. 1998. Turnover of dimethylsulfonopropionate (DMSP) by the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* M11 : ecological implications. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 281-290.
- Jorgensen, B. B. & Des Marais D.J. 1986. Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 179-186.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, p

- Kühl, M. & Fenchel T. 2000. Bio-optical Characteristics and the Vertical Distribution of Photosynthetic Pigments and Photosynthesis in an Artificial Cyanobacterial Mat. *Microb. Ecol.* **40**: 94-103.
- Kühl, M. & Jørgensen B.B. 1994. The light field of microbenthic communities : Radiance distribution and microscale optics of sandy coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.* **39**(6): 1368-1398.
- Lambersten Larsen, K., Cox R.P. & Miller M. 1994. Effects of illumination intensity on bacteriochlorophyll *c* homolog distribution in *Chloroflexus aurantiacus* grown under controlled conditions. *Photosynth. Res.* **41**: 151-156.
- Madigan, M.T., Martinko J.M. & Parker, J. 2000. Brock, Biology of anaerobic microorganisms. Ninth Edition,, Prentice Hall, New Jersey. 991 p.
- Madigan, M.T., & Ormerod J.G. 1995. Taxonomy, Physiology and Ecology of Heliobacteria, p. 17-30. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Massé, A. 1998. Adaptation chromatique des bactéries du cycle du soufre: Étude en vue de l'utilisation des pigments comme biomarqueurs des paléoenvironnements aquatiques. DEA, Université Bordeaux 1, 31p.
- Melø, T. B., Frigaard N.U., Matsuura K & Razi Naqvi. 2000. Electronic energy transfer involving carotenoids pigments in chlorosomes of two green bacteria: *Chlorobium tepidum* and *Chloroflexus aurantiacus*. *Spectrochimica Acta Part A* **56**: 2001-2010.
- Montesinos, E., Guerrero R. Abella C. & Esteve I. 1983. Ecology and Physiology of the Competition for Light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(5): 1007-1116.
- Navarrete, A., Peacock A., Macnaughton S.J., Urmeneta J. Mas-Castellà, White D.C. & Guerrero R. 2000. Physiological Status and Community Composition of Microbial Mats of the Ebro Delta, Spain, by Signature Lipid Biomarkers. *Microbiol. Ecol.* **39**: 92-99.
- Overmann, J. & van Gemerden H. 2000. Microbial interactions involving sulfur bacteria : implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 591-599.
- Overmann, J., Coolen M.J.L. & Tuschak C. 1999. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA genes fragments. *Arch. Microbiol.* **172**: 83-94.

- Overmann, J., Hall K.J., Northcote T.G. & Beatty J.T. 1999. Grazing of the copepod *Diaptomus connexus* on purple sulphur bacteria in a meromictic salt lake. *Environ. Microbiol.* **1**(3): 213-221.
- Overmann, J., Beatty J. T., Krouse H.R. & Hall K.J. 1996. The sulphur cycle in the chemocline of a meromictic salt lake. *Limnol. Oceanogr.* **41**(1): 147-156.
- Overmann, J., Beatty J. T. & Hall K.J. 1994. Photosynthetic activity and population dynamics of *Amoebobacter purpureus* in a meromictic saline lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 309-320.
- Overmann, J., Cypionka H. & Pfennig N. 1992. An extremely low-light adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black-Sea. *Limnol. Oceanogr.* **37**(1): 150-155.
- Overmann, J. & Pfennig N. 1992. Continuous chemotrophic growth and respiration of Chromatiaceae species at low oxygen concentrations. *Arch. Microbiol.* **158**: 59-67.
- Overmann, J., Beatty, J.T., Hall, K.J., Pfennig, N., Northcote, T.G. 1991. Characterization of a dense, purple sulfur bacterial layer in a meromictic salt lake. *Limnol. Oceanogr.* **36**(5): 846-859.
- Palenik, B. 2001. Chromatic adaptation in Marine *Synechococcus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 991-994.
- Pedros-Alió, C., Montesinos E. & Guerrero R. 1983. Factors Determining annual Changes in Bacterial Photosynthetic Pigments in Holomictic Lake Ciso, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(5): 999-1006.
- Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria ; p. 3-18. *In* R.K.Clayton & W.R. Bowien (eds) *The Photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York and London.
- Pfennig, N. 1975. The phototrophic bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant and Soil* **43**: 1-16.
- Pierson, B. K. & Parenteau N.M. 2000. Phototrophs in high iron microbial mats : microstructure of mats in iron-depositing hot springs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 181-196.
- Pierson, B. K., Sands V.M. & Frederick J.L. 1990. Spectral Irradiance and Distribution of Pigments in a Highly Layered Marine Microbial Mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(8): 2327-2340.
- Pierson, B., Oesterle A. & Murphy G.L. 1987. Pigments, light penetration, and photosynthesis activity in the multi-layered microbial mats of Great Sippewissett Salt Marsh, Massachusetts." *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 365-376.

- Pringault, O., Epping E., Guyoneaud R. Khalili A. & Kühl M. 1999 (a). Dynamics of anoxygenic photosynthesis in an experimental green sulphur bacteria biofilm. *Environ. Microbiol.* **1**(4): 295-305.
- Pringault, O., de Wit R. & Kühl M. 1999 (b). A Microsensor Study of the Interactions between Purple Sulfur and Green Sulfur Bacteria in Experimental Benthic Gradients. *Microb. Ecol.* **37**: 173-184.
- Repeta, D.J. 1993. A high resolution historical record of Holocene anoxygenic primary production in the Black sea. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **57**: 4337-4342.
- Rodrigo, M.A., Camacho A., Vicente E. & Miracle M.R. 1999. Microstratified distribution and migration of phototrophic microorganisms during a diel cycle in Lake Arcas-2 (Spain). *Arch. Hydrobiol.* **145**(4): 497-512.
- Sanchez, O. & Mas J. 1999. Kinetics of photoacclimation in cultures of *Chromatium vinosum* DSM 185 during shifts in light irradiance. *Microbiology* **145**: 827-833.
- Sanchez, O., van Gemerden H. & Mas J. 1998. Acclimation of the photosynthetic response of *Chromatium vinosum* to light-limiting conditions. *Arch. Microbiol.* **170**: 405-410.
- Schaub, B. E. M. & van Gemerden H. 1996. Sulfur bacteria in sediments of two coastal ecosystems: the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost, France. *Hydrobiologia* **329**: 199-210.
- Schmidt, K. A., Neerken S, Permentier H.P., Hager-Braun, C & Ames J. 2000. Electron transfer in Reaction Center Core Complexes from the Green Sulfur Bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium tepidum*. *Biochemistry* **39**: 7212-7220.
- Schmidt, K. 1978. Biosynthesis of carotenoids, p. 729-750. *In* R.K. Clayton & W.R. Sistrom (eds), *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York.
- Schmidt, K.A. *et al.* 1994. Analysis of Pigments carotenoids and Related Polyenes, p. 403-461. *In* M. Goodfellow and A.G. O'Donnell (eds), *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. John Wiley & Sons.
- Senge, M.O. & Smith K.M. 1995. Biosynthesis and structures of bacteriochlorophylls, p. 137-151 *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Smith, K.M. 1994. Nomenclature of the bacteriochlorophylls *c*, *d*, and *e*. *Photosynth. Res.* **41**: 23-26.

- Stal, L.J. 1994. Microbial mats in coastal environments, p. 21-32. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- Stal, L. J. & Caumette P. 1993. Microbial Mats: Future Research Developments, p. 147-152. *In*, R. Guerrero and C. Pedros-Alio (eds), *Trends in Microbial Ecology: Proceedings on the Sixth International Symposium on Microbial Ecology*, Barcelona, Spanish Society for Microbiology.
- Stal, L., van Gemerden H. & Krumbein W.E. 1985. Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 111-125.
- Steensgard, D., van Walree C.A., Permentier H. Bañeras L, Borrego C.M., Garcia-Gil J., Aartsma T.J., Amesz J & Holzwarth A.R. 2000. Fast energy transfer between Bchl *d* and BChl *c* in chlorosomes of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochimica and Biophysica Acta* **1457**: 71-80.
- Steensgard, D., van Walree C.A., Bañeras L, Borrego C.M., Garcia-Gil J. & Holzwarth A.R. 1999. Evidence for spatially separate bacteriochlorophyll *c* and bacteriochlorophyll *d* pools within the chlorosomal aggregate of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Photosynth. Res.* **59**: 231-241.
- Steiger, S., Schäfer L. & Sandmann G. 1999. High-light dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **52**: 14-18.
- Sybesma, C. & Olson J.M. 1963. Transfer of chlorophyll excitation energy in green photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **49**: 248-253.
- Tokita, S., Hirota M., Frigaard N.P., Shimada K & Matsuura K. 1999. Pheophytinization of bacteriochlorophyll *c* and energy transfer in cells of *Chlorobium tepidum*. *Arch. Microbiol.* **172**: 40-44.
- Trüper H.G., & Pfennig N. 1992. The family Chlorobiaceae, p. 3583-3592. *In*: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder. & K.H Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New-York.
- van den Ende, F. P & van Gemerden H. 1994. Relationships between functional groups of organisms in microbial mats, p. 339-355. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- Van Gemerden, H. 1993. Microbial Mats: A joint venture. *Marine Geology* **113**: 3-25.

- van Gemerden, H. & de Wit R. 1989. Phototrophic and Chemotrophic growth of the Purple Sulfur Bacterium *Thiocapsa roseopersicina*, p. 313-319. In, Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- van Gemerden, H. 1987. Competition between purple sulfur bacteria and green sulfur bacteria: Role of sulfide, sulfur and polysulfides. *Acta Academia Aboensis* **47**(2): 13-27.
- Van Gemerden, H. 1984. The sulfide affinity of phototrophic bacteria in relation to the location of elemental sulfur. *Arch. Microbiol.* **139**: 289-294.
- Van Gemerden, H. & Beeftink H.H. 1981. Coexistence of *Chlorobium* and *Chromatium* in a sulfide-limited culture. *Arch. Microbiol.* **129**: 32-34.
- Vila, X., Abella C. A., Figueras J.B. & Hurley J.P. 1998. Vertical models of phototrophic bacterial distribution in the metalimnetic microbial communities of several freshwater North-American kettle lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 287-299.
- Vila, X., Dokulil M., Garcia-Gil L.J., Abella C.A., Borrego C.M. & Bañeras L. 1996. Composition and distribution of phototrophic bacterioplankton in the deep communities of several central European lakes: The role of light quality. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol.* **48**: 183-196.
- Vila, X & Abella C.A. 1994. Effect of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynth. Res.* **41**: 53-65.
- Vila, X. & Abella C.A. 1993. Comparison of light spectral distribution in some waterbodies of Banyoles area (Girona, Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 100-104.
- Ward, D. M., Weller R., Shiea J. Castenholz R.W. & Cohen Y. 1989. Hot Spring Microbial Mats: Anoxygenic and Oxygenic Mats of Possible Evolutionary Significance, p. 3-15. In Y. Cohen and E. rosenberg (eds), Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- Young, A. & Britton G. 1993. Carotenoids in Photosynthesis. Chapman et Hall, 498 p.
- Zuber, H. & Cogdell R.J. 1995. Structure and Organization of Purple Bacterial Antenna Complexes, p. 315-348. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

I. Présentation des souches bactériennes.	39
I.1. Les bactéries sulfureuses vertes, Chlorobiaceae	39
I.2. Les bactéries sulfureuses pourpres, Chromatiaceae	40
II. Techniques de culture.	40
II.1. Culture liquide	41
II.1.1. Milieu de culture	42
II.1.2. Maintien des cultures pures de bactéries phototrophes sulfureuses	43
II.2. Culture en sédiment artificiel: Les Chambres benthiques à Gradients	43
II.3. Lumière utilisée pour le culture des bactéries phototrophes sulfureuses	44
II.3.1. Culture liquide	44
II.3.2. Culture en Chambre Benthique à Gradients	45
III. Méthodes d'analyse physiques et chimiques.	45
III.1. Dosage des protéines en culture liquide	45
III.2. Mesures électrochimiques et optique dans le sédiment artificiel (culture en chambre benthique à gradients)	46
III.2.1. Mesures électrochimiques	46
III.2.1.1. L'électrode à oxygène	46
III.2.1.2. L'électrode à pH	46
III.2.1.3. L'électrode à sulfures	47
III.2.1.4. Calculs des taux de consommation d'oxygène et de sulfure	47
III.2.1.5. Calculs des flux de diffusion	48
III.2.2. Mesures optiques	49
III.2.2.1. Mesure de la radiation de champs	49
III.2.2.2. Mesure de l'irradiance scalaire	49
III.2.2.3. Calculs à partir des profils de lumière	49
III.3. Dosage des pigments chlorophylliens et caroténoïdes	50
III.3.1. Chromatographie Liquide Haute Pression UV-Vis (CLHP UV-Vis)	50
III.3.2. Chromatographie Liquide Haute Pression et Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (CLHP-CL-SM)	52
III.3.3. Quantification des pigments	53
Références bibliographiques	54

I. Présentation des souches bactériennes

Les différentes expériences réalisées dans les chapitres III, IV et V ont été menées sur deux familles de bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses vertes et pourpres, c'est à dire les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae.

I.1. Les bactéries sulfureuses vertes : Chlorobiaceae

La souche bactérienne étudiée dans les chapitres III et IV est *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404. Cette souche bactérienne provient du souchier de collection du laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon (Université Bordeaux 1, France) où elle a été isolée par le Dr. Rémy Guyonneaud. Cette souche bactérienne est issue d'un sédiment lagunaire situé sur le Domaine de Certes, localisé au Nord du Bassin d'Arcachon (Lat. 44°40'N – Long. 1°10'O). C'est une bactérie de forme sphérique, immobile et anaérobie stricte. En conséquence, *P. aestuarii* CE 2404 ne peut croître qu'en l'absence totale d'oxygène par photolithoautotrophie, en utilisant la lumière comme source d'énergie et le sulfure ou le soufre élémentaire comme principaux donneurs d'électron pour la photosynthèse (Imhoff, 1995). Cette souche bactérienne a d'ailleurs été récemment étudiée par Guyonneaud *et al.* (2001). Chez *Prosthecochloris aestuarii*, les pigments contenus dans les unités photosynthétiques ou chlorosomes sont essentiellement de type Bactériorchlorophylle *c* (BChl. *c*). La famille des caroténoïdes, pigments à vocation de transfert d'énergie ou de rôle photoprotecteur, est représentée par des pigments de la série du chlorobactène (Cbt). On y trouve de plus, mais toujours en faibles quantités de la Bactériorchlorophylle *a* (BChl *a*) pouvant être présente dans le centre réactionnel ou associée à lui, dans la protéine FMO ou dans la lamelle basale.

L'autre souche bactérienne choisie pour les expériences menées dans le chapitre IV sur les adaptations pigmentaires des bactéries sulfureuses vertes est *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6030. C'est une souche d'origine pélagique. La culture pure provient du souchier de collection du Département d'Écologie Aquatique de l'Université de Girona (Espagne) où elle a été isolée des eaux du Lac Banyoles (Espagne) par le Dr. Jesus Garcia-Gil. Comme *Prosthecochloris aestuarii*, *Chlorobium phaeobacteroides* est une bactérie anaérobie stricte qui ne peut croître que par photolithoautotrophie avec le sulfure ou le soufre élémentaire comme donneur d'électron majeur pour la photosynthèse. Les chlorosomes contiennent de la

Bacteriochlorophylle *e* (BChl. *e*) et des caroténoïdes de la série de l'isoréniératène lui conférant une couleur brun-rougeâtre comme pigments majeurs. Tout comme chez *Prosthecochloris aestuarii*, la BChl. *a* est présente en faible quantité.

I.2. Les bactéries sulfureuses pourpres, Chromatiaceae

La bactérie sulfureuse pourpre choisie pour les expériences d'interactions entre bactéries sulfureuses vertes et pourpres reportées au chapitre III est *Thiocapsa roseopersicina* 5811 (DSM 5653). *T. roseopersicina* 5811 est une bactérie pourpre sulfureuse, provenant du souchier de collection du Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon (université Bordeaux I). Cette souche bactérienne a été originellement isolée à partir d'un sédiment lagunaire de l'Étang du Prévost (Lat. 43°30'N- Long. 3°54'E, France) et a été désignée comme *Thiocapsa forma specialis*, car contient de l'okénone et non de la spirilloxanthine comme caroténoïde majeur. *Thiocapsa roseopersicina* 5811 est une bactérie de forme sphérique (1.2 – 3 µm diamètre) capable de croître par photolithotrophie utilisant différentes formes de composés soufrés comme le sulfure, le sulfite, le thiosulfate ou le soufre élémentaire comme donneurs d'électron pour la photosynthèse (Madigan *et al.* 2000). De par sa capacité à tolérer la présence d'oxygène, *Thiocapsa roseopersicina* est aussi capable de croître par chimiolithotrophie, utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons et le sulfure ou le thiosulfate comme donneur d'électrons (Imhoff, 1995). Les pigments majeurs présents chez *T. roseopersicina* 5811 sont des caroténoïdes de la série de l'okénone (Okn) (Caumette *et al.* 1985) et la Bactériochlorophylle *a* (BChl. *a*) lui conférant une couleur pourpre-violet.

II. Techniques de culture

Les techniques de culture des bactéries sont diverses en fonction de leur nature et de leur utilisation. Dans notre cas, la culture des bactéries phototrophes sulfureuses peut être réalisée en milieu liquide ou solide.

II.1. Culture liquide

Les cultures liquides permettent de réaliser et maintenir une culture pure de bactéries phototrophes sulfureuses puis d'en suivre l'évolution et la croissance. Ce type de culture est celui qui nous permet d'obtenir les précultures nécessaires aux travaux réalisés dans les chapitres III et IV.

De plus, l'étude de la composition pigmentaire des bactéries sulfureuses décrite dans le chapitre IV, nécessite la présence d'une biomasse bactérienne importante. Il nous faut donc pouvoir suivre la croissance bactérienne de façon précise. Or, dans le cas des cultures liquides, la croissance peut être considérée comme homogène et comporte 4 phases distinctes que sont, une phase de latence, une phase exponentielle de croissance, une phase de « plateau » et enfin une phase de décroissance correspondant à la mort des cellules suite à l'épuisement du milieu. La croissance bactérienne en culture « en batch » est définie, pendant la phase log-exponentielle, par la relation suivante :

$$X_t = X_0 e^{\mu t}$$

Soit :

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_t - \text{Ln } X_0}{t - t_0}$$

Dans cette relation, X représente la biomasse bactérienne déduite de la mesure de la densité optique représentative de la partie exponentielle de la courbe de croissance.

La culture « en batch » permet de suivre l'évolution d'une culture bactérienne dans un milieu approprié, sans que rien ne soit ajouté ni retiré au milieu après l'inoculation par les cellules bactériennes vivantes. Ainsi, la multiplication cellulaire n'est limitée dans le temps que par modification du milieu et de l'environnement des bactéries. Le suivi de la densité optique traduisant l'évolution de la biomasse dans le temps, nous permet alors de réaliser une courbe de croissance et d'y retrouver la biomasse bactérienne maximale nécessaire pour l'étude des pigments.

II.1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la culture des bactéries phototrophes sulfureuses «en batch» est un milieu synthétique, dont la composition de base est la même pour les bactéries vertes et les bactéries pourpres et proche de celle décrite par Biebl & Pfennig (1978) et Eichler & Pfennig (1988).

Cette composition contient, pour un litre de milieu : Eau distillée, 950 ml ; KH_2PO_4 , 0.35 g ; NH_4Cl , 0.5 g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g ; H_2SO_4 (2M), 1ml ; solution SL-12B (Eichler & Pfennig, 1986), 1 ml. Les sels suivants sont ensuite ajoutés selon les besoins de chaque souche bactérienne :

	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	<i>Prosthecochloris aestuarii</i> , <i>Thiocapsa roseopersicina</i>
NaCl	0 g	20 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g	0.5 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 g	1 g

Les milieux sont préparés dans une fiole conique (Widdel, 1980) et stérilisés à l'autoclave 30 minutes à 121°C sous une pression de 1 bar. Immédiatement après stérilisation, le milieu est refroidi sous atmosphère N_2/CO_2 (9 :1) jusqu'à température ambiante. Les solutions suivantes sont ensuite ajoutées de manière stérile :

- Solution de NaHCO_3 : 1.5 g de NaHCO_3 dissous dans 30 ml d'eau distillée, dégazée sous atmosphère N_2/CO_2 et stérilisée à l'autoclave.
- Solution de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: 0.75 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 10 ml d'eau distillée, dégazée sous atmosphère N_2 et stérilisée à l'autoclave.
- Solution de vitamines V7 (Pfennig & Trüper, 1992) stérilisée par filtration (0.2 μm) : 1ml.

Après ajout des solutions, le pH du milieu est ajusté à 6.8-6.9 pour les Chlorobiaceae et 7.2-7.3 pour les Chromatiaceae, à l'aide de solutions stériles de NaOH (2M) et H_2SO_4 (2M). Le milieu est distribué de façon stérile dans des flacons en verre (125 mL). Les flacons sont entièrement remplis afin de maintenir l'anoxie puis fermés par des bouchons en aluminium munis de septa. Les flacons sont conservés à l'obscurité jusqu'à inoculation.

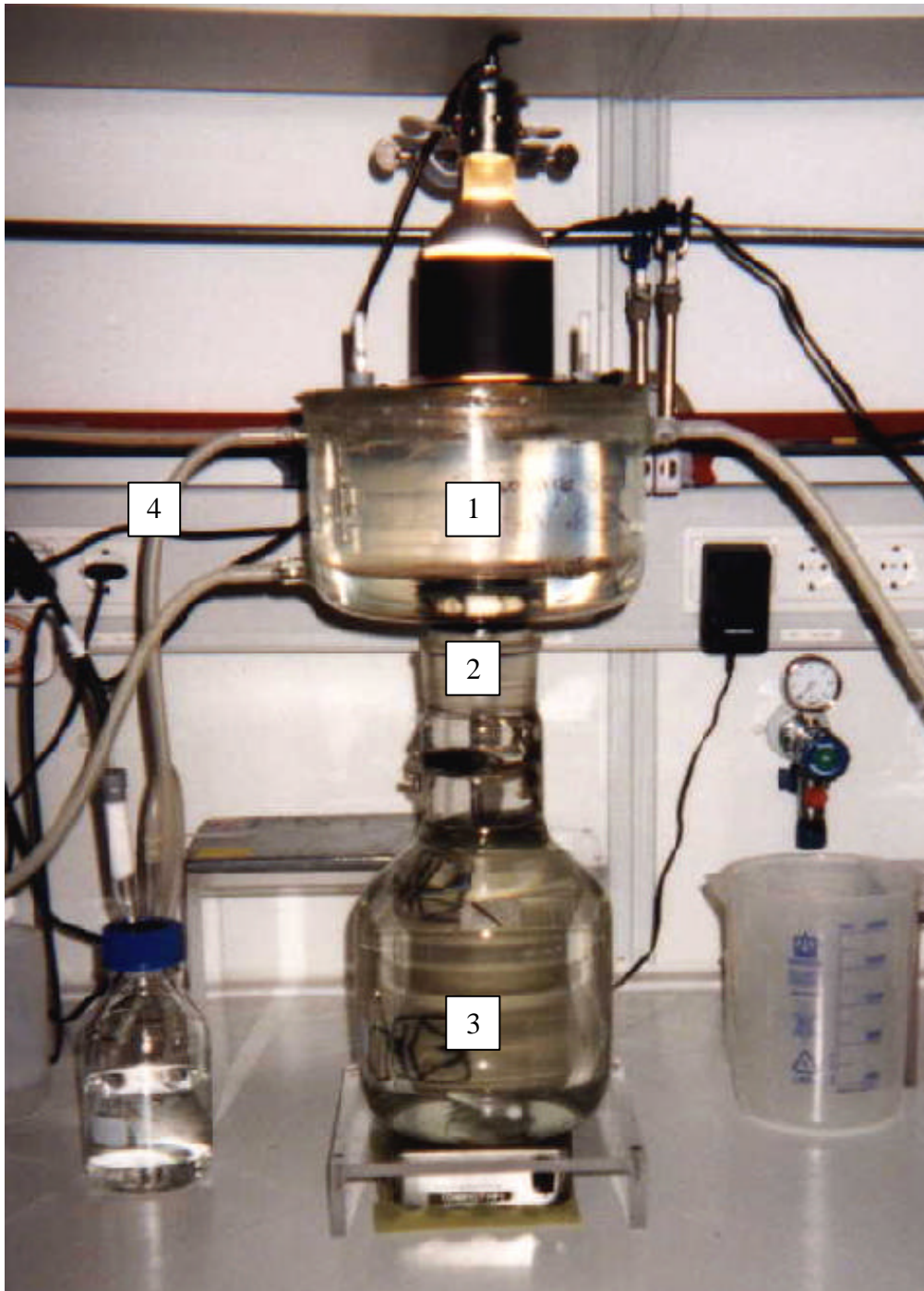


Figure II. 1: Photographie de la Chambre Benthique à Gradients (Pringault *et al.* 1996), utilisée pour les cultures de *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 et *Thiocapsa roseopersicina* 5811 en sédiment artificiel ; (1) : Compartiment supérieur oxique ; (2) : Carotte de sable ; (3) : Compartiment inférieur anoxique ; (4) : Arrivée d'air stérile.

Les milieux de culture sont inoculés à 10% à l'aide d'une préculture pure de Chlorobiaceae ou de Chromatiaceae. Ils sont ensuite placés à l'obscurité pendant 1 heure après inoculation. Enfin, les cultures sont placées à la lumière artificielle sous un régime 16 h lumière / 8 h obscurité.

II.1.2. Maintien des cultures pures de bactéries phototrophes sulfureuses.

Les flacons de culture pures sont "nourris" de façon stérile, régulière avec une solution de sulfure ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 100 mM) et carbonate (Na_2CO_3 , 200 mM) dont la préparation est basée sur le méthode de Siefert & Pfennig (1984). Préalablement à l'ajout dans les flacons de culture, la solution nutritive est neutralisée à l'aide d'une solution H_2SO_4 (2M) afin d'éviter toute modification de pH de la culture. Une fois «nourris», les flacons de culture sont maintenus à l'obscurité pendant 1 heure, puis placés sous sous un régime 16 h lumière / 8 h obscurité de lumière artificielle.

II.2. Culture en sédiment artificiel : Les Chambres Benthiques à Gradients

Le réacteur utilisé pour la culture des bactéries phototrophes sulfureuses en sédiment artificiel (voir chapitres III) est la Chambre Benthique à Gradients (BGC), mise au point par Pringault *et al.* (1996). Ce système comprend deux réacteurs (**figure II. 1**). Le réacteur supérieur simule le compartiment pélagique et le réacteur inférieur simule le compartiment benthique. Le réacteur supérieur (1) comprend un milieu oxique (2 litres). Grâce à la double paroi de verre du réacteur, une circulation d'eau permet de maintenir le milieu à une température constante de 20°C. Une arrivée d'air stérile dans le milieu permet l'oxygénation et maintient la saturation en oxygène à 230 μM . Le réacteur inférieur (3) contient un milieu anoxique (3 litres) dont la concentration en sulfure est de (40 mM).

Une carotte de sable (100-300 μm , Merck, Germany, réf. 1.077.11.5000), contenue dans une cylindre de nylon noir (Nylon, Ertalon 66 SA) est placée entre les deux réacteurs (2). Le fond de la carotte est constitué d'une membrane filtrante (maille : 63 μm). Un joint de silicone est placé à chaque extrémité de la carotte de sable pour permettre des échanges de solutés par diffusion moléculaire au sein de la carotte de sable.

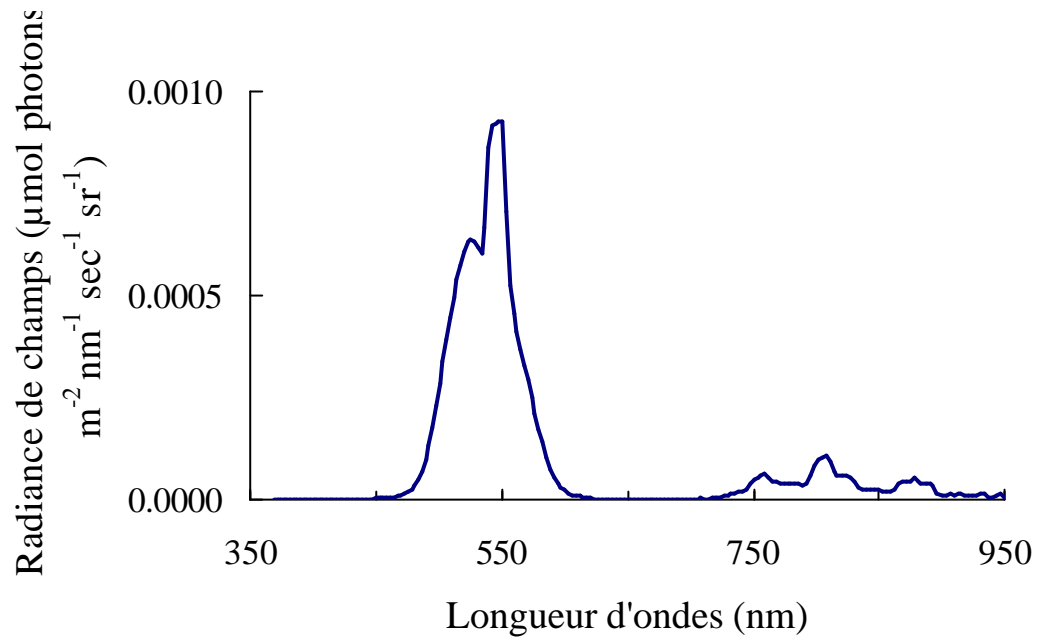


Figure II. 2: Spectre de radiance de champs de la lumière utilisée pour les cultures de bactéries phototrophes sulfureuses vertes en milieu liquide.

La composition de base des deux milieux est constituée d'eau de mer filtrée (0.22 μm), NH_4Cl (5 mM), KH_2PO_4 (0.5 mM), SL12 B sans EDTA (1 ml L^{-1}) (Pfennig & Trüper, 1992) et de la solution de vitamines V7 (Pfennig & Trüper, 1992) (1 ml L^{-1}). Afin de créer un gradient de bicarbonate parallèle au gradient de sulfure dans le système, les deux milieux sont enrichis avec une solution de NaHCO_3 stérile à des concentrations de 4 mM pour le milieu de réacteur supérieur et 80 mM pour le milieu du réacteur inférieur.

Le milieu du compartiment inférieur est préparé de façon stérile, sous atmosphère azotée. Afin d'éviter toute précipitation du carbonate, le pH est vérifié après chaque ajout de solution Na_2S stérile dans le milieu, et maintenu à 7.2-7.6. Lorsque la concentration en sulfure atteint 40 mM dans le réacteur inférieur, le pH est stabilisé à 7.3-7.4.

Le réacteur supérieur est ensuite emboîté dans le réacteur inférieur. Le tube de nylon est placé entre les deux réacteurs puis rempli de sable stérile. Le centimètre supérieur de la carotte est inoculé avec 15 mL de culture pure de *P. aestuarii* ou *T. roseopersicina* en phase exponentielle de croissance. La surface de la carotte est alors lissée, puis le réacteur supérieur est rempli avec le milieu correspondant préalablement préparé en flacons stériles. Une plaque de verre est placée sur le dessus du réacteur supérieur. La chambre est ensuite placée sous une source lumineuse (voir ci-après) et sous agitation magnétique pendant l'incubation. Le temps d'incubation nécessaire pour l'obtention d'un biofilm en chambre benthique à gradients est de 5 semaines (Pringault *et al.* 1996).

II.3. Lumière utilisée pour la culture des bactéries phototrophes sulfureuses.

II.3.1. Culture liquide

Le type de lumière utilisé pour la culture liquide et l'étude des pigments des bactéries phototrophes sulfureuses vertes, est décrite dans le chapitre IV. Les flacons de culture nouvellement inoculés sont placés sur une table d'agitation où ils sont maintenus en constante homogénéisation. Afin de limiter la proportion de rayons infrarouge (IR), la source lumineuse choisie est une lampe de type fluorescent (SON-T Agro, Philips) fixée à l'extrémité de la table basculante. Des filtres gélatine colorés (CAT 149 7395 n° 58, Kodak Wratten, Tiffen, USA) ont été placés entre la source lumineuse et les flacons de culture, de telle sorte que la composition spectrale de la lumière atteignant la surface de chaque flacon soit comprise entre 480 et 615 nm (**figure II. 2**). De plus, à l'aide de filtres gélatine neutres (Kodak Wratten, Tiffen,

USA) combinés aux filtres colorés et en fonction de la distance entre la source lumineuse et chaque flacon de culture, une large gamme d'intensités lumineuses a été obtenue. Ainsi, dix intensités différentes, 0.2, 0.8, 1.2, 3.5, 4.3, 6, 8.2, 9.2, 40 et 55.7 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, ont pu être mesurées à l'aide d'une sonde optique OL 4000 Q (DELTA Lys & Optik, Lyngby, Danemark) couplée à un amplificateur (1000 mV/1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). Le régime lumineux utilisé est 16 heures / 8 heures lumière / obscurité.

II.3.2. Culture en Chambre Benthique à Gradients

Le type de lumière utilisé pour les cultures en chambres benthiques à gradients est celui présenté dans les chapitres III et IV. La source lumineuse incandescente (100W, E27, Sylvania reflector), est placée au dessus du réacteur supérieur de la chambre benthique, combinée à un collimateur permettant de concentrer la source lumineuse vers la surface de la carotte de sable. Afin de filtrer les longueurs d'ondes proches de l'infrarouge, un filtre Hot Mirror (775FW82-50, Andover Corporation, USA) n'affectant pas la transmission de la lumière dans le visible, est placé sous le collimateur, juste au-dessus de la surface de la carotte de sable. Ainsi, la composition spectrale de la lumière atteignant la surface de la carotte est comprise entre 400 et 750 nm. Le régime lumineux utilisé est 16 heures / 8 heures lumière / obscurité.

III. Méthodes d'analyse physiques et chimiques

III.1. Dosage des protéines en culture liquide

La concentration totale des protéines dans les cultures liquides de *P. aestuarii* CE 2404 et *C. phaeobacteroides* UdG 6030 a été déterminée selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). La gamme étalon est réalisée à partir de sérum albumine bovine. L'échantillon de culture bactérienne (50 mL) est placé dans un tube préalablement lavé à l'acide sulfurique concentré afin d'éliminer toute résidu protéique potentiel. L'échantillon est centrifugé (3000 g, 20 minutes, Seli, Heraeus, France) puis traité par trois extractions successives à l'éthanol (95%). On dissout le culot obtenu dans 1 mL de solution NaOH (1M) (100°C, 10 mn). Après

refroidissement à température ambiante, on ajoute 5 mL de solution A (10 mn). L'échantillon est ensuite incubé dans 0.5 ml de solution B à température ambiante (30 mn). Après 30 minutes, la lecture de la densité optique se fait contre un blanc (NaOH) à 663 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (SAFAS, Monaco, France). La concentration en protéines de l'échantillon est ensuite calculée en reportant la Do lue sur la droite d'étalonnage préalablement déterminée (voir annexe).

Remarques :

- Solution A: solution de Na_2CO_3 (2%), 100ml ; solution de tartrate de sodium et potassium (2%), 1ml ; solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1%), 1ml.
- Solution B : Solution de réactif Folin Ciocalteus dilué dans de l'eau Elix (1:1)

III.2. Mesures électrochimiques et optiques dans le sédiment artificiel (culture en chambre benthique à gradients)

III.2.1. Mesures électrochimiques.

Des micro-électrodes ($\varnothing = 100\text{-}500 \mu\text{m}$) et des micro-électrodes ($\varnothing = 10\text{-}50 \mu\text{m}$) à oxygène, pH et sulfures ont été utilisées pour la réalisation de profils de concentrations de ces composés au sein des biofilms obtenus par culture en chambre benthique. C'est à partir de ces profils qu'ont pu être calculés les taux de respiration d'oxygène et d'oxydation du sulfure dans les biofilms (Pringault *et al.* 1996).

III.2.1.1. L'électrode à oxygène

L'électrode à oxygène est une sonde polarographique (type Clark) couplée à un pico-ampèremètre muni d'une unité de dépolarisation fournissant une différence de potentiel de -800 mV nécessaire à la réduction de l'oxygène.

III.2.1.2. L'électrode à pH

Le pH a été mesuré à l'aide de micro- et micro-électrodes en verre couplées à une électrode de référence au calomel (HgCl), l'ensemble étant connecté à un millivoltmètre à haute impédance. Les calibrations ont été effectuées à température ambiante (20°C) pour différentes valeurs de pH dans des tampons phosphate (0.2M) contenant 35 g L^{-1} de NaCl .

III.2.1.3. L'électrode à sulfures

Les profils de sulfures ont pu être mesurés à l'aide de deux électrodes. L'électrode potentiométrique est une micro-électrode à S^{2-} couplée à une électrode de référence au calomel. L'ensemble est connecté à un milli-voltmètre à haute impédance. L'électrode polarographique est une électrode à H_2S couplée à une électrode de référence (Ag/AgCl). Les deux électrodes sont reliées à un pico-ampèremètre couplé à une unité de polarisation fournissant une différence de potentiel de +85 mV nécessaire à l'oxydation de H_2S en S^0 (Jeroschewski *et al.* 1997).

III.2.1.4. Calculs des taux de consommation d'oxygène et de sulfure (Pringault *et al.* 1996).

Le transport de l'oxygène et du sulfure dans le sédiment s'effectue par des processus de diffusion (Bouldin, 1968). La forme d'un profil de concentration est le résultat de l'action combinée de la diffusion, de la consommation (K) et de la production (P) selon la seconde loi de Fick appliquée au sédiment (Bouldin, 1968; Revsbech & Jørgensen, 1986) :

$$\frac{\delta C(x,t)}{\delta t} = \phi \times D_s \frac{\delta^2 C(x,t)}{\delta x^2} + P(x) - K(x) \quad 1$$

Où C représente la concentration en soluté à un point x et au temps t, D_s le coefficient de diffusion dans le sédiment et ϕ la porosité du sable. P(x) et K(x) représentent respectivement le taux de production et de consommation par unité de volume de sédiment. Pour Berner (1980), cette équation ne tient pas compte de la porosité du sable ϕ , et les taux de production et de consommation P(x) et k(x) sont alors finalement exprimés par unité de volume d'eau interstitielle. Dans notre cas, la porosité était de 0.5, valeur déterminée à partir du rapport volumique de sable sec et de sable saturé en eau. D_s est relié au coefficient de diffusion dans l'eau (D_0) selon l'équation :

$$D_s = \frac{1}{\theta^2} D_0 \quad 2$$

θ^2 représentant la tortuosité du sédiment, sa valeur est fonction de la granulométrie, pour un sable fin (100-300 μm), est égale à 1.5 (Ullman & Aller, 1982). Ainsi, $\phi \times D_s$

= $0.333 \times D_0$, D_0 , étant déterminé à partir des tables Broecker & Peng (1974) reliant le coefficient de diffusion dans l'eau à la température. A l'état d'équilibre, l'équation 1 se simplifie de la manière suivante :

$$P(x) - K(x) = -\phi \times D_s \frac{\delta^2 C(x,t)}{\delta x^2} \quad 3$$

En l'absence du terme de production P, le taux spécifique de consommation K d'un composé peut être exprimé comme le produit du coefficient de diffusion et de la dérivée seconde du profil de concentration à l'état stationnaire (Pringault *et al.* 1996). Finalement, la concentration en soluté peut s'exprimer de la manière suivante (Nielsen *et al.* 1990) :

$$C(x,t) = ax^2 + bx + c = \frac{K}{\phi D_s} x^2 + bx + c \quad 4$$

La distribution avec la profondeur des taux de consommation d'oxygène et d'oxydation du sulfure a donc été obtenue par l'ajustement de polynômes d'ordre deux aux parties courbes du profil de concentration selon la méthode décrite par Nielsen *et al.* (1990), à partir des équations 3 et 4 :

$$K = 2a \times \phi D_s \quad 5$$

Les taux par unité de surface ont ensuite été calculés en multipliant le taux d'ordre zéro par l'épaisseur de la zone où se produisait la réaction.

III.2.1.5. Calculs des flux de diffusion

Les apports en soluté dans un sédiment se font par des processus de diffusion selon la première loi de Fick appliquée au sédiment (Bouldin, 1968):

$$J(x) = -\phi \times D_s \frac{\delta C(x)}{\delta x} \quad 6$$

J représente le flux en un point x. Dans le cas de l'oxygène, J a été estimé à partir du gradient de concentration à l'interface eau - sédiment selon la méthode décrite par

Rasmussen & Jørgensen (1992). Les flux de sulfure ont été calculés à partir de la partie linéaire du profil de concentration.

III.2.2. Mesures optiques.

La distribution de la lumière dans le sédiment est mesurée à l'aide de sondes optiques. Les coefficients d'atténuation sont calculés à partir des profils de lumière. Deux types de sondes permettent de mesurer à la fois la radiation de champs, déterminant la distribution qualitative de la lumière et l'irradiance scalaire, permettant de connaître la quantité de lumière disponible dans le sédiment. Ces sondes sont connectées à un détecteur (Spectroscopy instruments, O-SMA) composé d'un spectrographe (Jarrel Ash, Monospec 18) et d'un analyseur optique multi-canaux (Princeton EIRY detector ; 1024 canaux).

III.2.2.1. Mesure de la radiation de champs

La radiation de champs est mesurée à l'aide d'une fibre optique (\varnothing extrémité = 50 μm ; angle d'acceptation dans l'eau 17.2°). La sonde est introduite dans le sable avec un angle de 30° par rapport à la verticale. Les mesures de spectres sont réalisées avec une résolution spatiale de 100 μm .

III.2.2.2. Mesure de l'irradiance scalaire

L'irradiance scalaire est mesurée à l'aide d'une fibre optique couplée à une sphère en méthacrylate (\varnothing extrémité = 70 μm). Comme pour les mesures de radiation de champs, la sonde est introduite dans le sédiment avec un angle de 30° par rapport à la verticale. La résolution spatiale est de 150 μm .

III.2.2.3. Calculs à partir des profils de lumière

Les coefficients verticaux d'atténuation de la radiation de champs K , et de l'irradiance scalaire (K_{E0}) sont mesurés selon la méthode décrite par Pringault *et al.* (1996). Ainsi, l'atténuation de la radiation de champs entre deux points peut être calculée par l'équation (Kühl & Jørgensen, 1994) :

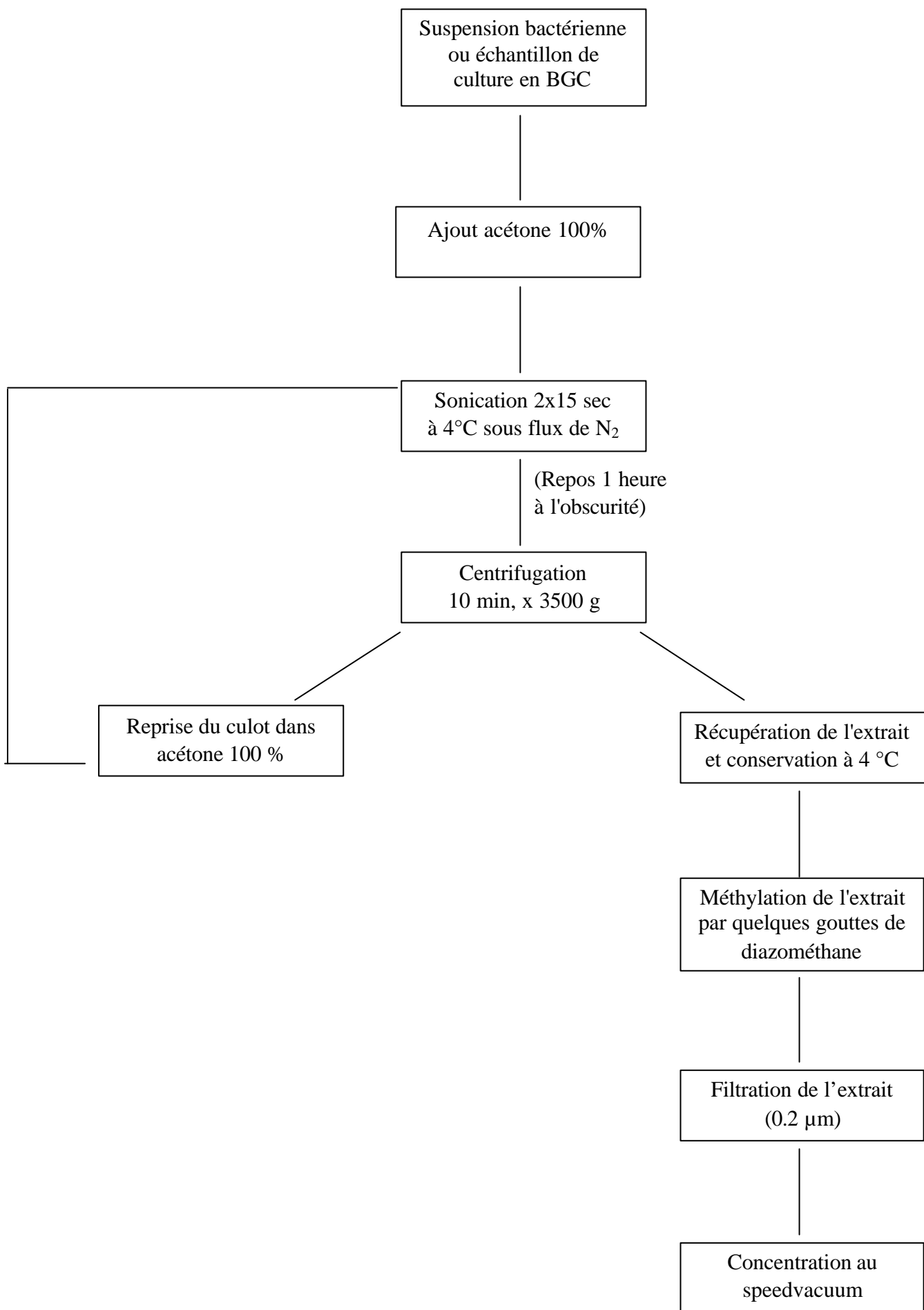


Figure II. 3: Schéma du protocole d'extraction des pigments avant analyse CLHP UV-Vis et CLHP-SM.

$$K = \frac{\ln(L_1/L_2)}{z_2 - z_1} \quad 7$$

z_1 et z_2 représentent deux points du sédiment; L_1 et L_2 représentent la radiation de champs aux profondeurs z_1 et z_2 , respectivement.

Le coefficient d'atténuation de l'irradiance scalaire K_{E0} est calculé à partir de l'équation suivante d'après (Kühl & Jørgensen, 1994) :

$$K_{E0} = \frac{\ln(E_{01} / E_{02})}{z_1 - z_2} \quad 8$$

E_{01} et E_{02} représentent l'irradiance scalaire aux profondeurs z_1 et z_2 , respectivement. Ce coefficient de l'irradiance scalaire a été calculé pour un spectre compris entre 430-950 nm à partir de profils mesurés dans le sable vierge.

III.3. Dosage des pigments chlorophylliens et caroténoïdes

III.3.1. Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) UV-Vis

Extraction des pigments

Le protocole d'extraction utilisé pour l'analyse par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) des échantillons de culture liquide et de cultures en sédiment artificiel est décrit à la **figure II. 3**. Concernant les teneurs pigmentaires des échantillons solides de sédiment obtenus après culture en chambre benthique à gradients, des tests de lyophilisation ont été effectués. Dans notre cas, la lyophilisation entraîne un biais dans la quantification des pigments. Ainsi, pour un même échantillon, nous avons noté une perte d'environ 48% de la teneur en chlorobactène et 11% de la teneur en bactériochlorophylle *c* (voir tableau 1). De plus, bien que l'intégration automatique des bactériophaeophorbides soit plus performante dans le cas de l'échantillon lyophilisé, les spectres représentatifs de ces pigments sont beaucoup plus nets lorsque l'échantillon n'est pas lyophilisé. Considérant ces observations, nous avons choisi de travailler directement sur des échantillons frais de carotte de sédiment. Après décongélation à 4°C, les carottes de sable ont donc été pesées (poids frais) et les pigments ont été extraits suivant le même protocole que celui

utilisé pour les cultures liquides (voir **figure II. 3**). Après concentration au speed vacuum, les extraits sont conservés à l'obscurité et à 4°C, avant analyse par CLHP.

Analyse

L'analyse des échantillons est réalisée selon le protocole de Lemaire *et al.* (sous presse). L'extrait sec concentré après passage au speed vacuum est dissous dans le solvant A d'analyse CLHP. Le système comprend une pompe binaire TSP100 couplée à un spectrophotomètre TSP UV6000 (ThermoSeparation Products) à barrettes de diodes qui permet une analyse en temps réel de tout le spectre UV-visible entre 300 et 800 nm, avec un trajet optique de 5 cm. Le bruit de fond est de moins de 5.10^{-5} unité d'absorbance. Les extraits sont injectés par un passeur automatique programmable TSP AS100 à boucle de 100 µl réfrigéré à 4°C. La séparation est faite sur une colonne RP greffée (CIL-CLUSEAU) thermostatée à 50°C, de dimensions 250x4 mm et de taille de particules de 5µm. Le méthode est celle décrite par Wright *et al.* (1991) modifiée pour l'utilisation d'une pompe binaire. Le solvant A est constitué de méthanol, d'acétonitrile, 0.05 M d'acétate d'ammonium (50/45/5 v/v et pH=7,2) et le solvant B d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'acétonitrile (80/19/1 v/v). Le gradient des solvants d'analyse programmé est le suivant :

Temps (mn)	% Solvant A	% Solvant B
0	100	0
10	100	0
50	0	100
55	0	100
60	100	0

Le débit est de 0.6 ml mn⁻¹ et l'élution complète dure 65 minutes. L'identification des pigments est faite en comparant les temps de rétention des pics et les spectres d'absorption obtenus (voir ci-dessous).

III.3.2. Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) et Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (CL-SM)

Extraction des pigments

Les échantillons de culture bactérienne (5 ml) congelés sont extraits à l'acétone (100%, 4°C). L'échantillon est centrifugé (5min à 3000 g, Jouan B3.11). Le surnageant est filtré puis les extraits sont récoltés, concentrés *in vacuo* et conservés à l'obscurité à 4°C avant analyse.

Analyse

L'analyse des échantillons par CLHP et CL-SM est réalisée selon le protocole de Airs *et al.* (2001). La CLHP en phase inverse utilise un système Waters (Milford, MA USA) comprenant un passeur automatique 717, un système de contrôle 600MS et un détecteur 996-photodiode. Le contrôle des instruments, l'acquisition et l'analyse des données sont réalisés grâce au logiciel Waters Millennium 2010. Tous les solvants sont dégazés à l'hélium. La séparation est faite en mode phase inverse sur une colonne ODS2 3 μ (Waters Spherisorb) de dimensions 150 x 4.6 mm (Longueur x diamètre interne), couplée à une pré-colonne contenant la même phase (10 mm x 5 mm de diamètre interne). Un filtre (Phenomenex, Security Guard, C18 ODS Octadecyl, 4 mm x 3 mm de diamètre interne) permet d'éviter la détérioration rapide de la pré-colonne. La méthode utilise un gradient de solvants comprenant acétonitrile, acétate d'ammonium 0.01 M et acétate d'éthyle dont le programme est le suivant (Airs *et al.*, 2001) :

Temps (mn)	% Ammonium acétate (0.01 M)	% Méthanol	% Acétonitrile	% Acétate d'éthyle
0	5	80	15	0
5	5	80	15	0
81	1	32	15	52
85	5	80	15	0

Le débit est de 0.7 ml mn⁻¹ et l'élution complète dure 85 minutes. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-CL-SM) utilise un système

Finnigan (San Jose, CA, USA) comprenant un passeur d'échantillons Thermo Separation AS3000, une pompe P4000, un détecteur UV-Vis UV2000 (Thermo Quest, Heml Hempstead, UK) et un spectromètre de masse à capture d'ion (Finnigan MAT LCQ) équipé d'une source ACPI. La méthode CLHP est identique à celle décrite précédemment. Les paramètres de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse sont les suivantes : température du capillaire 150°C, température de vaporisation de l'ACPI 450°C, courant de décharge 5 μ A, flux de gaz dans la gaine 60 (unité arbitraire). La détection UV/vis est effectuée à 473 nm.

Préparation, isolation et hydrolyse des phaeophytines

Afin de déméthyliser les chlorophylles, un extrait de culture dans du diéthyl éther (20mL) a été vigoureusement mélangé avec de l'acide hydrochlorique (10 mL ; 2M) dans un tunnel de séparation. La couche acide est séparée, la couche éther parfaitement lavée à l'eau distillée et l'extrait séché et concentré *in vacuo*.

L'extrait de pigment acétonique déméthyllé est purifié par chromatographie sur sucrose (diamètre 2 cm, longueur 20 cm) grâce à une phase hexane mobile (qualité CLHP) sous atmosphère N₂. La fraction phaeophytine purifiée est ensuite transformée par trans-estérification en phaeophorbide méthyl ester par reflux dans 50 mL de 1M KOH/MeOH pendant 1 heure. Après refroidissement, le mélange est additionné de HCl (30 mL, 2M) et de dichlorométhane (100 mL, qualité CLHP) dans un tunnel de séparation. La couche organique est séparée, minutieusement lavée à l'eau distillée et concentrée *in vacuo* sur une fine couche de silicate dans une pipette pasteur avant chromatographie. L'échantillon est traité avec du diazométhane. La fraction alcoolique éluée avec 50 : 50 Dichlorométhane (DCM) : MeOH est concentrée *in vacuo*.

III.3.3. Quantification des pigments

Etant donné qu'il n'existe pas de standard bactérien disponible, les pigments identifiés par CLHP UV-Vis et CLHP LC-MS, sont quantifiés grâce à leur coefficients d'extinction molaire respectifs. Ainsi, les valeurs suivantes de coefficients d'extinction ont été utilisées : 86 L g⁻¹ cm⁻¹ à 440 nm pour la BChl *c* (Stal *et al.* 1984), 84.1 L g⁻¹ cm⁻¹ à 770 nm pour la BChl *a* (Fenchel, 1998), 49.1 L g⁻¹ cm⁻¹ à 654 nm pour la BChl *e* (Borrego *et al.* 1999), 304 L g⁻¹ cm⁻¹ à 440 nm pour le chlorobactène (Foppen, 1971),

232 L g⁻¹ cm⁻¹ à 440 nm pour l'okénone (Foppen, 1971) et 236 L g⁻¹ cm⁻¹ à 440 nm pour l'isoréniératène (Foppen, 1971). La concentration des pigments dans un échantillon est calculée à partir de la loi de Beer-Lambert. On détermine tout d'abord la quantité M (g) de pigments contenue dans le volume d'extrait injecté pour l'analyse :

$$M = \frac{X \times 10^{-6} (\text{AU} \times \text{sec}) \times (Y \times 10^{-3})/60 (\text{L} \cdot \text{sec}^{-1})}{\alpha (\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times \text{TO} (\text{cm})}$$

Où X = Aire en AU x sec; Y = Débit en mL.min⁻¹; α = le coefficient d'extinction molaire propre à chaque pigment et TO, le trajet optique = 5 cm.

La quantité totale de pigment M_T présente dans le volume total d'extrait V_T, c'est à dire le volume de solvant dans lequel l'extrait sec a été repris, est finalement:

$$M_T (\text{g}) = \frac{M (\text{g}) \times V_T (\text{L})}{V_r (\text{L})}$$

avec V_r = V_e - V_m où V_e est le volume d'injection et V_m, le volume mort.

Références bibliographiques

- Airs, R.L., Atkinson J.E. & Keely B.J.K. 2001. Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *J. Chromatogr. A.* **917**: 167-177.
- Berner, R.J. 1980. Early diagenesis: a theoretical approach. Princeton University Press (eds), Prinetone, New Jersey.

- Biebl, H. & Pfennig N. 1978. Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **117**: 9-16
- Borrego, C.M., Arellano J.B., Abella C.A., Gillbro T & Garcia-Gil J. 1999. The molar extinction coefficient of bacteriochlorophyll *e* and the pigment stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides*. *Photosynth. Res.* **60**: 257-264.
- Bouldin, D. 1968. Models describing the diffusion of oxygen and other mobile constituents across the mud-water interface. *J. Ecol.* **56**: 429-455.
- Broecker, W.S. & Peng T.H. 1974. Gas exchange rates between air and sea. *Tellus* **26**: 21-35.
- Caumette, P., Schmidt C., Biebl H., & Pfennig N. 1985. Characterization of a *Thiocapsa* strain containing okenone as major carotenoid. *System. Appl. Microbiol.* **6**: 132-136.
- Eichler, B. & Pfennig N. 1988. A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter pupureus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **149**: 395-400
- Fenchel, T. 1998. Formation of laminated microbial mats in the absence of benthic fauna. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**: 235-240.
- Foppen, F. H. 1971. Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* **14**: 133-298.
- Guyoneaud, R. 1996. Étude écologique, physiologique et systématique des communautés de bactéries phototrophes anoxygénaiques en milieu lagunaire méditerranéen et atlantique. Thèse Université de Bordeaux 1 (n°1387), 225p.
- Guyoneaud, R., Borrego C.M., Martinez-Planells A., Buitenhuis E.T. & Garcia-Gil L.J. 2001. Light responses in the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*: changes in prosthecae length, ultrastructure, and antenna pigment composition. *Arch. Microbiol.* **176** : 278-284.
- Imhoff, J. F. 1995. Taxonomy and Physiology of phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria, p 1-15. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Jeroschewski, P., Steuckart C., & Kühl M. 1997. An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Anal. Chem.* **24**: 4351-4357.
- Kühl, M., & Jørgensen B.B. 1994. The light field of microbenthic communities : Radiance distribution and microscale optics of sandy coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.* **39** (6): 1368-1398.

- Kühl, M., & Jørgensen B.B. 1992. Spectral light measurements in microbenthic phototrophic communities with a fiber-optic microprobe coupled to a sensitive diode array detector. *Limnol. Oceanogr.* **37** (8): 1813-1823.
- Lemaire, E., Abril G., de Wit R., & Etcheber H. Distribution of phytoplankton pigments in nine European estuaries and implications for an estuarine typology. *Biogeochemistry*, sous presse.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* **193**: 265-275.
- Madigan, M. T., Martinko J. M., & Parker J. 2000. Prokaryotic Diversity: Bacteria, p 454-544. *In* M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker (eds) *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, Ninth Edition.
- Nielsen, L.P., Christensen P.B., Revsbech N.P. & Sorensen J. 1990. Denitrification and oxygen respiration in biofilms studied with a microsensor for nitrous oxide and oxygen. *Microb. Ecol.* **19**: 63-72.
- Pfennig, N. & Trüper H.G. 1992. The family Chromatiaceae, p. 3200-3221. *In* A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer (eds). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New-York.
- Pringault, O., de Wit R., & Caumette P. 1996. A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 237-250.
- Rasmussen, H. & Jørgensen B.B. 1992. Microelectrode studies of seasonal oxygen uptake in a coastal sediment: role of molecular diffusion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **81**: 289-303.
- Revsbech, N. P., & Jørgensen B. B. 1986. Micro-electrodes. Their use in microbial ecology. *Adv. Microbiol. Ecol.* **9**: 293-352.
- Revsbech, N. P. 1989. An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol. Oceanogr.* **34**: 472-476.
- Siefert, E. & Pfennig N. 1984. A convenient method to prepare neutral sulfide solution for cultivation of phototrophic sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **139**: 100-101.
- Stal, L. J., van Gemerden H., & Krumbein W.E. 1984. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J. Microbiol. Meth.* **2**: 295-306.
- Ullman, W.S. & Aller R.C.. 1982. Diffusion coefficients in nearshore marine sediments. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 552-556.

Widdel, F. 1980. Anaerober abbau von fettsäuren und benzoessäure durch neue isolierte arten sulfate-reduzierenden bacterien. Ph. D Thesis, Göttingen University, FRG.

Wright, S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjørnland T., Repeta D. & Welschmeyer N. 1991. Improve HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **77**: 183-196.

CHAPITRE III**ÉTUDE EXPERIMENTALE DE BIOFILMS DE BACTERIES SULFUREUSES VERTES ET
POURPRES CULTIVES EN SEDIMENT ARTIFICIEL**

Introduction _____ 59

Effet de la qualité lumineuse sur la photo-oxidation du sulfure et la croissance de la bactérie sulfureuse verte *Prosthecochloris aestuarii*, cultivée dans un biofilm artificiel.

Effect of light quality on sulfide photo-oxidation and growth in an artificial biofilm of the Green Sulfur Bacterium Prosthecochloris aestuarii.

Massé A., O. Pringault & R. de Wit, Photosynth. Res., sous presse _____ 61

Étude expérimentale des interactions entre bactéries sulfureuses vertes et pourpres cultivées dans un sédiment sableux exposé à une lumière dépourvue d'Infrarouge.

Experimental Study of Interactions between Purple and Green Sulfur Bacteria in Sandy Sediments exposed to Illumination deprived of Near Infrared.

Massé A., O. Pringault & R. de Wit, Appl. Environ. Microbiol., soumis _____ 79

Conclusion _____ 102

INTRODUCTION

Ce premier chapitre de résultats a pour objet l'étude de la croissance des bactéries sulfureuses vertes et pourpres dans les systèmes sédimentaires submergés, c'est à dire dont la colonne d'eau est supérieure à celle des milieux lagunaires peu profonds, où ces micro-organismes sont habituellement retrouvés. Notre étude simule le cas d'écosystèmes où la colonne d'eau peu atteindre plusieurs mètres. Dans ce cas, la lumière qui parvient à la surface du sédiment, est fortement atténuée d'une part par la profondeur de la colonne d'eau et d'autre part par tous les organismes vivants phototrophes ou non, qui s'y développent. De ce fait, les conditions lumineuses à la surface du sédiment sont telles que le spectre est fortement appauvri en rayons infrarouges (IR) et l'intensité lumineuse considérablement diminuée.

Les Chlorobiaceae sont des micro-organismes qui, dans le sédiment participent à la formation de tapis microbiens et participent au cycle de la matière organique. De plus, elles conditionnent les processus de détoxification du sédiment puisqu'elles oxydent le sulfure toxique provenant des couches profondes, en soufre élémentaire puis en sulfate, qui à l'opposé du sulfure ne sont pas toxiques et peuvent donc être tolérés par les organismes vivants. La première partie du chapitre portera sur l'étude d'un représentant des Chlorobiaceae fréquemment retrouvé dans les tapis microbiens, *Prosthecochloris aestuarii*, afin de savoir si cette souche bactérienne est capable de s'affranchir de conditions lumineuses critiques et si tel est le cas, comment elle y parvient. Pour cela, un biofilm de *P. aestuarii* sera cultivé en sédiment artificiel dans des conditions expérimentales de sulfure, oxygène et pH les plus proches de celles du milieu naturel et sous des conditions lumineuses dépourvues de rayons IR, simulant le cas des systèmes submergés. Afin de déterminer l'impact de la qualité lumineuse sur la croissance de *P. aestuarii*, des mesures de gradients physico-chimiques (pH, sulfure et oxygène) et d'atténuation de la lumière seront réalisés à l'aide de microsondes et micro-électrodes, en conditions lumineuses expérimentales (peu de rayons IR) et optimales (enrichies en rayons IR), à la fin de la période d'incubation. Ainsi, le biofilm pourra être localisé et l'effet de la qualité lumineuse sur les processus de photo-oxydation des Chlorobiaceae déterminé.

Dans les tapis microbiens, les bactéries sulfureuses vertes coexistent avec les bactéries sulfureuses pourpres. Aussi dans la deuxième partie de ce chapitre, nous étudierons dans quelles mesures la qualité lumineuse affecte cette coexistence des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae lorsqu'elles sont cultivées, en culture mixte, sous les mêmes conditions lumineuses critiques que celles décrites ci-dessus. Pour cela, des biofilms mixtes de *P.*

aestuarii et de la souche bactérienne de Chromatiaceae *Thiocapsa roseopersicina* seront cultivés sous lumière dépourvue d'infrarouge tout comme dans la première partie. La localisation des biofilms dans le sédiment sera réalisée par la distribution de l'atténuation de la radiance à 750 et 800 nm, maximum d'absorption *in vivo* de la BChl. *c* et de la BChl. *a*, respectivement caractéristiques de *P. aestuarii* et *T. roseopersicina*. Enfin, les pigments marqueurs des deux familles seront quantifiés par analyses de Chromatographie liquide à Haute Pression (CLHP) et utilisés comme indicateurs de biomasse bactérienne. Ces biomasses bactériennes estimées pour chaque souche en culture mixte seront ensuite comparées avec celles obtenues dans des biofilms axéniques.

Effect of light quality on sulfide photo-oxidation and growth in an artificial biofilm of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*

Astrid Massé¹, Olivier Pringault^{1,2} & Rutger de Wit^{1,3}

¹*Laboratoire d'Océanographie Biologique, CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2 rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France*

²*Max-Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Microsensor Group, Celsiusstraße 1, D-28359 Bremen, Germany*

³*Correspondence to : R. de Wit, Laboratoire d'Océanographie Biologique, CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2 rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France ;*

E-mail : r.de-wit@biocean.u-bordeaux.fr

Key words : Anoxygenic photosynthesis, Benthic Gradient Chamber, microsensor, near infrared light, pigment analysis, visible light

Abstract

We have succeeded in culturing an axenic biofilm of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 in an artificial sandy sediment under visible light (400-700 nm). This simulates the conditions of deep submerged sediments. A five-week incubation period, using a 16 hours light / 8 hours dark regime, was applied in the benthic gradient chamber (BGC). The biofilm was located below the oxygen penetration depth of 1.2 mm, namely between 1.5 and 2.5 mm and the biomass peak was at 2.1 mm depth. This is much shallower compared to previously described artificial mats of *P. aestuarii* that were grown in the BGC under near infrared (NIR)-rich light. High resolution time courses of photosynthesis were measured as sulfide photo-oxidation rates and studied under visible light and visible amended with NIR light to assess the effect of light quality. Sulfide photo-oxidation rates were rather low under visible light and strongly stimulated at most depths under full light conditions. However, under the latter conditions the rates decelerated after a maximum rate was reached at 8-10 min, apparently due to diffusional limitation of sulfide supply. It was concluded that the top of the mat was not limited by the photon flux density, while the biomass peak and the bottom of the biofilm were severely light limited under the culture conditions. These results support the hypothesis that a biofilm of *P. aestuarii* can develop in deep submerged sediments, when the oxygen penetration depth is very shallow. Nevertheless, the addition of NIR light strongly enhances the potential of *P. aestuarii* to grow deeper in the sediment.

Abbreviations : BGC – Benthic Gradient Chamber; L/D – Light / Dark; NIR - near infrared; Vis. – Visible

Résumé

Un biofilm axénique de la bactérie sulfureuse verte *Prosthecochloris aestuarii* a été obtenu par culture dans un sédiment artificiel sous lumière visible (400-700 nm). Ces conditions lumineuses simulent les conditions lumineuses présentes dans les sédiments submergés par une colonne d'eau profonde. La culture a été réalisée dans la chambre benthique à gradients pendant une période d'incubation de trois semaines sous un régime lumineux 16 heures lumière / 8 heures obscurité. Le biofilm était localisé sous la profondeur de pénétration de l'oxygène, i.e. 1.2 mm, entre 1.5 et 2.5 mm de profondeur et le pic de biomasse à 2.1 mm. Ceci est peu profond comparé aux valeurs obtenues dans de précédents tapis microbiens de *P. aestuarii* obtenu en chambre benthique à gradients sous lumière enrichie en infrarouge. Afin de déterminer l'effet de la qualité lumineuse, l'évolution de la photosynthèse anoxygénique a été mesurée à partir des taux d'oxydation de sulfure et étudiée à la fois en lumière visible et en lumière visible enrichie en infrarouge. Les taux de photo-oxidation du sulfure mesurés en lumière visible étaient relativement faibles et fortement augmentés pour la majorité des profondeurs lorsque les conditions lumineuses étaient optimales. Cependant, en conditions optimales, après avoir atteint une valeur maximale au bout de 8 à 10 minutes, les taux diminuaient fortement, probablement suite à une limitation des apports diffusifs de sulfure. Il a été conclu que la densité du flux de photons ne constitue pas un facteur limitant pour la surface du biofilm. Au contraire, dans les conditions lumineuses imposées pour la culture, la lumière limite les taux de photo-oxidation du sulfure au niveau du pic de biomasse et à la base du biofilm. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle un biofilm de *P. aestuarii* peut se développer dans des sédiments profonds, caractérisés par une faible profondeur de pénétration de l'oxygène. Néanmoins, l'addition de longueurs d'ondes proches de l'infrarouge permet à *P. aestuarii* de se développer plus profondément dans le sédiment.

Introduction

Green sulfur bacteria proliferate in aquatic environments, where anoxic layers containing reduced sulfur compounds are exposed to light (Van Gemerden and Mas 1995). These strictly anaerobic organisms form buoyant plates and biofilms at well-defined depths in the water column and in the sediment, respectively. The stratification patterns in both habitats bear a functional resemblance, but major differences include scale and quality of the light climate (de Wit 2000). The water column strongly absorbs red and near infrared (NIR) light. In contrast, the shorter wavelengths are more strongly attenuated than red and NIR light in the highly scattering sediment environment. Many studies have reported about important modifications of pigment composition in planktonic green sulfur bacteria, as a response to the prevailing light conditions (e.g., Vila and Abella 1994; Borrego and Garcia-Gil 1995). Only a few descriptive studies have reported about the prevailing light conditions for pigment composition and photosynthetic activity of green sulfur bacteria in intertidal sediments (Pierson *et al.* 1987, 1990).

The Benthic Gradient Chamber (BGC) is a device that has been developed for the cultivation and experimental study of photosynthetic biofilms of green and purple sulfur bacteria (Pringault *et al.* 1996). Hence, physicochemical gradients and photosynthetic activities have been analyzed in artificial biofilms of *P. aestuarii* adapted to NIR-rich light (Pringault *et al.* 1998, 1999), which simulates the conditions in intertidal and very shallow sediment environments. In the present study, we have simulated the critical light conditions in deeper submerged sediments, which are characterized by extremely low NIR. The aim was to study the potential for growth of *P. aestuarii* in such environments and how the photosynthesis of this benthic species is affected by the quantity and quality of the photon flux density.

Methods

Bacterial strains

The green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 from the culture collection of the Laboratory of Biological Oceanography (University of Bordeaux I, Arcachon, France) was cultured as an axenic biofilm, under a 16 hours / 8 hours light / dark

regime (L/D) of visible light. *P. aestuarii* is a nonmotile bacterium and its morphology is spherical with extrusions (prosthecae). This strain contains bacteriochlorophyll *c* and carotenoids from the chlorobactene series as major pigments.

P. aestuarii CE 2404 is strictly anaerobic and grows photolithotrophically with sulfide and elemental sulfur as electron donors. Thiosulfate and sulfite are not used as electron donors, and the latter compound is even inhibitory for growth.

Culture conditions

The biofilm of *P. aestuarii* CE 2404 was cultured in artificial fine-sand sediments using the Benthic Gradient Chamber (BGC) described by Pringault *et al.* (1996). A brief description is given below. An artificial sediment core (50 mm internal diameter, 45 mm length) is sandwiched between an upper oxic and a lower anoxic chamber of 2000 ml and 3500 ml, respectively. The latter provides the sulfide for photosynthesis. Vertical transport of solutes in the sediment core is exclusively due to molecular diffusion. This results in opposed gradients of oxygen, bicarbonate and sulfide. The sand (Merck, Germany) had a grain size of 100-300 μm . The top cm of the sediment core was inoculated with 15 ml of a liquid batch culture of *P. aestuarii* CE 2404 transferred during the exponential growth phase.

Both media in the upper and the lower chamber were composed of filtered seawater (0.2 μm) amended with NH_4Cl , KH_2PO_4 , SL12B without EDTA, and vitamin solution V7 (see Pringault *et al.* 1996 for details). Oxygen concentration in the overlying water was maintained at 230 μM by aeration using filter-sterilized air. The upper medium was amended with 4 mM NaHCO_3 . An equilibrium was rapidly established between this culture medium and the air provided through an air-lift, resulting in a stable pH of 8.2-8.3. In the lower chamber, NaHCO_3 and Na_2S were added to final concentration of 80 mM and 40 mM, respectively. This allowed a complete photolithoautotrophic oxidation of sulfide to sulfate. The final pH in the lower medium was 7.3-7.4, thus resulting in the establishment of vertical gradients of pH and bicarbonate within the sediment core. Salinity and temperature were maintained constant at 30‰ and 20°C, respectively during the five-week incubation time. The loss of sulfide from the lower compartment was < 6 % during the five-week incubation period, meaning that it acts as an almost constant source (Pringault *et al.* 1996).

The BGC was illuminated from above by a collimated light beam of an incandescent lamp (100W, E27, Sylvania reflector) using a 16 hours / 8 hours light / dark regime. A Hot Mirror Filter (775FW82-50, Andover Corporation, USA) was placed in the light-path (below

the collimator) to suppress infrared wavelengths. As a result, the downwelling irradiance at the sediment surface was $168 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $11.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 400-700 nm and 700-900 nm, respectively. In order to test the effect of the gradients conditions on the photosynthetic pigments of *P. aestuarii*, we compared the pigment composition of the *P. aestuarii* biofilm with those of liquid batch cultures of the same organism grown on sulfide under green light (450-600 nm with a maximum intensity at 550 nm), covering a range of intensities (3.5 to $55.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Experiments with microsensors

A 5 week-incubation period allowed the establishment of a biofilm of *P. aestuarii* strain CE 2404 in the BGC. After this period, a series of experiments was performed sequentially in the device. During the first experiment, the light conditions and L/D regimen were maintained as used for culturing and the solute profiles were measured at the end of the 16 h light and 8 h dark periods. Short L/D cycles of 30 min L/30 min D were applied during the second series of experiments. Visible light conditions (same as used for culturing) were compared with full light conditions (visible amended with NIR light). Illumination with a combination of visible and NIR irradiation was provided by removing the Hot Mirror Filter. The BGC was opened and the optical and chemical microsensors were introduced from the side under 150° zenith angle relative to the incident light in order to prevent shading of the measurement spots. pH variations in the core were suppressed by replacing the upper medium by a KH_2PO_4 buffer (100 mM, pH 7.2) amended with 30 g l^{-1} NaCl. This improved the accuracy for the calculations of total dissolved sulfide concentrations ($\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$ and S^{2-}), afterwards referred to as sulfide. All measurements were made on the same 1 cm^2 surface of the sand core with a vertical resolution of $150 \mu\text{m}$.

Microscale light measurements

Light measurements were performed with fibre-optic microprobes (scalar irradiance and field radiance microprobes) connected to a cooled optical spectrophotometer (O-SMA) (Kühl and Jørgensen 1992). The scalar irradiance is the appropriate parameter to describe the photon flux density available for photosynthesis, while backscattered radiance profiles provide a better proxy for visualizing the depth distribution of the pigment-containing cells. The measurement and calibration procedures have been described by Pringault *et al.* (1998). The maxima of scalar irradiance and backscattered radiance were aligned with the sediment

surface. The light attenuation coefficient for backscattered field radiance was defined as the rate of change of \ln -transformed radiance values with depth (see Kirk 1994 and Pringault *et al.* 1998 for details).

Oxygen, sulfide and pH measurements

Procedures for measuring dissolved hydrogen sulfide (H_2S), oxygen (O_2) and pH have been described in detail by Pringault *et al.* (1998) and are summarized below. Oxygen concentration measurements were operated using a Clark-type oxygen microelectrode with a guard cathode (Revsbech 1989). Dissolved hydrogen sulfide concentrations were measured using an amperometric H_2S microelectrode (Jeroschewski *et al.* 1996). pH measurements were made with a glass microelectrode (Revsbech and Jørgensen 1986) connected to a high-impedance millivoltmeter with a calomel electrode as a reference. Sulfide concentrations express total dissolved sulfide ($\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$ and S^{2-}), which was calculated from the dissolved H_2S concentration and the pH value (Pringault *et al.* 1998). The three microelectrodes were mounted on the micro-manipulator (Märzhauser, Germany), at the same horizontal level; the distance between them was less than 2 mm (see Pringault *et al.* 1998 for details).

H_2S concentrations and pH were monitored during the short light-dark cycles and this procedure was repeated sequentially at different depths. It was checked that the sulfide concentration returned to the same value after completion of the L/D cycle. Hence, it was possible to deduce the transient state depth profiles of sulfide measured at high time resolution during the L/D cycles. The transient rates of sulfide photo-oxidation were calculated at different depths from the numerical solution of the differential equations according to the Fick's Second Law. The theory and procedure have been developed originally by Epping *et al.* (1999) for oxygen dynamics and adapted for sulfide dynamics by Pringault *et al.* (1999). Accordingly, anoxygenic photosynthesis is calculated as the rate of sulfide photo-oxidation, which is a volumetric rate expressed per unit porewater volume.

Pigment analysis

The pigment composition of the biofilm of *P.aestuarii* was studied by Liquid Chromatography (HPLC). The sediment core with the biofilm was extracted from the BGC, frozen, and stored at -80°C . The superficial sediment comprising the biofilm (1.5 cm width)

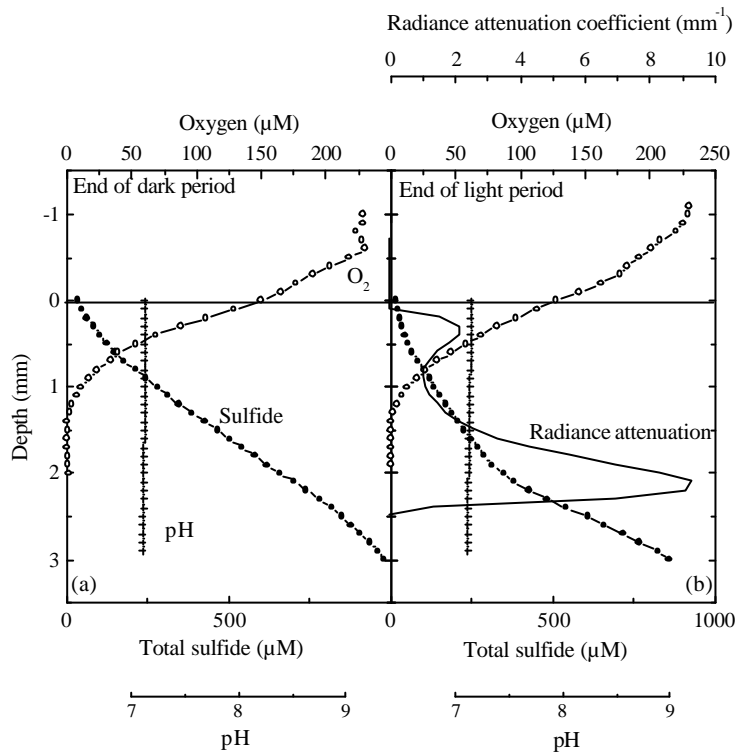


Figure III. 1: Sulfide (\cdot), oxygen (o) and pH ($+$) profiles in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 cultured in the BGC under visible light (L/D = 16 h - 8 h). Left-hand graph represents situation at the end of the 8 h dark period; right-hand graph represents situation at the end of the 16 h light period. The radiance attenuation profile for 750 nm measured under full light conditions, is given as a proxy for the *P. aestuarii* biofilm location (the attenuation coefficient for sterile sediment is approximately 1 mm^{-1}).

was homogenized. Pigments were extracted in 5 ml acetone (100%, 4°C) by sonicating for 30 seconds under N₂ flush and stored at -30°C for 3 hours. Extracts were separated from sediment by centrifugation (x 3000 g, 10 min). The material was extracted three times, pooled and stored overnight under N₂ flush at -80°C. The Liquid Chromatography System used in this study was described by Lemaire *et al.* (2001).

Results

Description of the *Prosthecochloris aestuarii* biofilm

After a five-week incubation period under a L/D regime = 16 h/8 h using visible light, a biofilm of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 was obtained in the Benthic Gradient Chamber. Optical microscopic observations only showed the typical morphologies of *P. aestuarii* indicating that aseptic conditions had been maintained and that the biofilm was axenic. The backscattered radiance profile at 750 nm, which is the *in vivo* maximum absorption for this bacteriochlorophyll *c*-containing strain, first indicated a peak of absorbing material about 0.3 mm below the surface, due to methodological smoothing of data combined with abiotic attenuation by the sand itself. The biofilm was located between 1.5 and 2.5 mm below the sediment surface (Figure III. 1, right panel). The biomass peak, inferred from the maximum radiance attenuation (9.3 mm⁻¹), was found at 2.1mm depth.

The diel variations of the physicochemical conditions in the biofilm are shown in Figure III. 1, which depicts the depth profiles of sulfide, O₂ and pH measured at the end of the 8 hours dark and 16 hours light period, respectively. The sediment oxygen profiles were similar at the end of the dark and light periods. The oxygen concentrations decreased almost linearly in the 0.5 to 0.8 mm diffusion boundary layer above the sediment and further decreased with depth in the sediment until reaching zero at 1.1-1.2 mm below the surface. Hence, the sediment was permanently anoxic below 1.2 mm depth, where the biofilm developed. The sulfide profiles showed strong diel variations reflecting the effect of sulfide photo-oxidation during the light period. At the end of the dark period, sulfide reached the sediment surface and the profile indicated sulfide efflux across the sediment-water interface into the water column. Sulfide and oxygen coexisted in the top 1.2 mm of the sediment. The high concentrations of both compounds in this layer indicate low turnover rates, which is

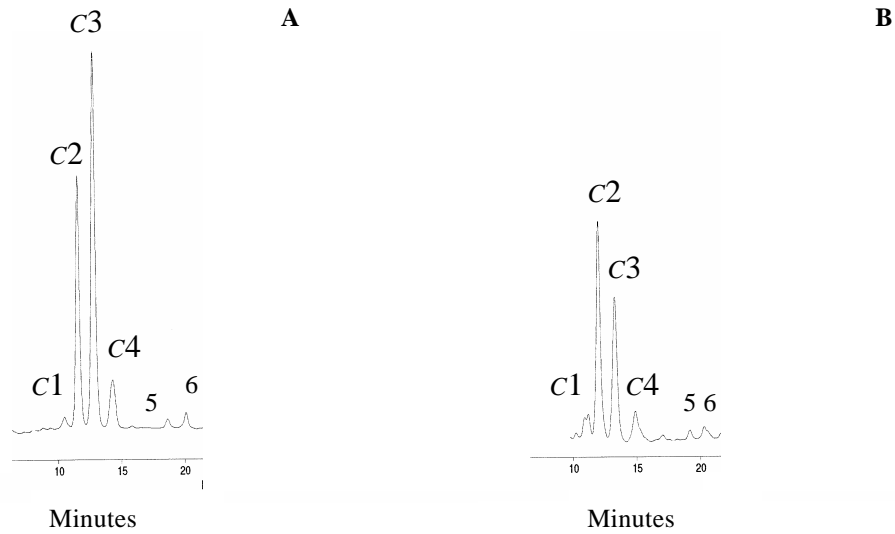


Figure III. 2: Partial HPLC pigment chromatograms obtained from the *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 biofilm cultured in the BGC under visible light (A) and from a liquid batch culture (B) of the same organism cultured under green light at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Other batch cultures grown at higher photon flux densities up to $55.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ showed similar chromatograms as depicted for the current batch culture. Photometric detection was at 440 nm. c1, c2, c3 and c4 are different farnesol-esterified homologues of bacteriochlorophyll c, 5 and 6 bacteriochlorophyll a.

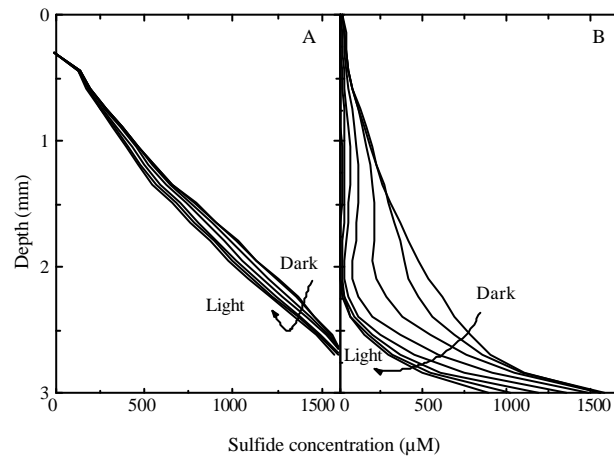


Figure III. 3: Effect of short L/D cycles (30 min L/30 min D) on sulfide profiles in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404. The transient profiles have been obtained from sequential monitoring at different depths (see Methods). The profiles are given for selected depths and represent the transition from dark to light. The time interval between two successive profiles is 2 minutes. A: visible light (culture conditions); B: full light conditions (visible enriched with NIR).

consistent with an exclusively abiotic chemical reaction of oxygen and sulfide (Millero 1986). The sulfide concentrations in the biofilm ranged between 850 μM and 460 μM at the bottom and top of the biofilm, respectively. At the end of the 16 h light period, the sulfide concentrations in the biofilm ranged between 600 μM and 230 μM at the bottom and top of the biofilm, respectively. Below the biofilm, the sulfide concentration increased linearly with depth indicating a steady supply by diffusion from the reservoir. The pH in the biofilm was 7.1 and constant with depth and time. This was achieved by the addition of a phosphate buffer to the overlying medium prior to the measurements and had the advantage that the calculation of the depth profile of total sulfide was more precise (see Methods).

The pigment composition of the *P. aestuarii* biofilm is depicted on partial HPLC chromatograms and have been compared to pigment chromatograms obtained from liquid batch cultures of *P. aestuarii* grown under green light exposure, in Figure III. 2. The chromatograms depicted the first bacteriochlorophyll *c* homologue series, eluted between 10 and 15 minutes (peaks *c*1-*c*4, denominated following Borrego and Garcia-Gil 1994), and bacteriochlorophyll *a* (peak 5-6). The third bacteriochlorophyll *c* homologue (BChl *c*3) was the most abundant in the biofilm. Pheophytins have not been detected. In the liquid culture, for the range of green light intensities from 3.5 to 55.8 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, the second slightly more hydrophilic bacteriochlorophyll *c* homologue (BChl *c*2) was the predominant pigment.

Analyses of sulfide oxidation activity during short-term light/dark cycles

The short-term sulfide photo-oxidation was analyzed in detail in the *P. aestuarii* biofilm by applying short L 30 min / D 30 min cycles. Visible light as used during culture conditions has been compared with full light conditions (visible light combined with NIR). The visible light used comprised a very minor proportion of infrared light, i.e. the scalar irradiance at the sediment surface was 517 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 430-700 nm and 37 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 700-850 nm. The corresponding scalar irradiance at the sediment surface for full light conditions was 495 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 430-700 nm and 576 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 700-850 nm. A selection of transient sulfide profiles following the shift from dark to light is shown in Figure III. 3. A minor change of sulfide profiles was observed upon exposure to visible light (Figure III. 3A), whereas strong variation of profiles was observed upon exposure to full light conditions (Figure III. 3B). This reflects rather low sulfide photo-

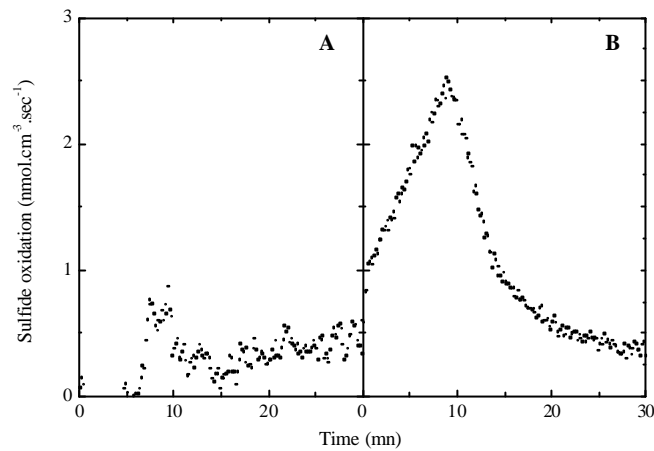


Figure III. 4: Time course of the sulfide photo-oxidation rate upon a shift from dark to light, at the biomass peak, i.e. 2.1 mm, in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 exposed to short L/D cycles (cf. Figure 3). A: visible light (culture conditions); B: full light conditions (visible enriched with NIR).

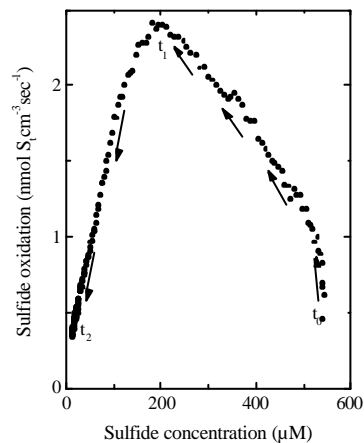


Figure III. 5: Trajectory of the relationship between the sulfide photo-oxidation and sulfide concentration at the biomass peak, i.e. 2.1 mm in the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 exposed to short L/D cycles using full light conditions (visible enriched with NIR, cf. Figure 4B). t_0 , t_1 and t_2 are respectively measurements after 0, 8 and 30 minutes of light exposure.

oxidation rates in the biofilm under visible light exposure and a strong stimulation when NIR light was added.

The time-courses of the transient sulfide photo-oxidation rates at 2.1 mm depth (biomass peak in the biofilm) upon the transition from dark to light is shown in Figure III. 4 for visible light (Figure III. 4A) and full light conditions (Figure III. 4B), respectively. Upon exposure to visible light, a 7 min lag-phase was observed, a maximum rate of $0.7 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ occurred around 10 min and afterwards the rate leveled off to $0.3\text{-}0.5 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Figure III. 4A). Upon full light exposure, the initial rate was $1 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$, it linearly increased until a maximum of $2.5 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ was reached at 8 min and then dropped at a decelerating rate (Figure III. 4B). This time-course was studied in more detail. Therefore, a plot of the sulfide photo-oxidation rate against the remaining free sulfide concentration is shown in Figure III. 5. This Figure shows an apparent inhibition of sulfide photo-oxidation at t_0 , an increase of the rate concomitant with decreasing sulfide concentrations during the first ten min until the maximum rate of $2.5 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ is reached at a sulfide concentration of $200 \text{ }\mu\text{M}$. After $t_1 = 8 \text{ min}$, the rate decreases concomitantly with the decreasing sulfide concentration. An almost linear relationship between the sulfide photo-oxidation rate and the sulfide concentration is apparent between 0 and $100 \text{ }\mu\text{M}$ of sulfide.

Vertical gradients of limiting conditions within the *P. aestuarii* biofilm

In order to study the influence of photon flux density on the photosynthetic activity in the *P. aestuarii* biofilm, we measured the scalar irradiance profiles through the biofilm under both light conditions and compared those with the maximum of the transient sulfide oxidation rates observed during the dark-light shift experiments (cf. Figures III. 3, III. 4 and III. 5). Table III. 1 shows this comparison of scalar irradiance and maximum sulfide photo-oxidation rates for the top, peak and bottom of the biofilm when exposed to visible light (culture conditions) and visible enriched with infrared light (full light conditions). The scalar irradiance values were integrated between 430-700 nm and 700-850 nm wavelengths, which correspond to photons that can be absorbed by the BChl *c* Soret band + carotenoids and the BChl *c* Q_y band, respectively (Blankenship *et al.* 1995).

The visible light used comprised a minor fraction of NIR; as a result, NIR was still detectable ($5.5 \text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) at the surface of the biofilm (1.5 mm), which was

Table III. 1: Scalar irradiance and maximum sulfide oxidation rates measured under culture and full light conditions, at different depths (top, biomass peak and bottom) within the biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404.

Location (mm below the Surface of the sand core)	Culture conditions			Full light conditions		
	Scalar irradiance ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Maximum sulfide oxidation rate ($\text{nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	Total	Scalar irradiance ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Maximum sulfide oxidation rate ($\text{nmol sulfide cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	Total
	430-700	700-850	Total	430-700	700-850	Total
Top (1.5)	47.5	5.5	53	33.9	78.6	112.5
Maximum biomass (2.1)	19	2.5	21.5	7.1	22	29.1
Bottom (2.5)	4.25	0.7	4.95	1.8	5.5	7.3

Table III. 2: Comparison of biofilm location, biomass peak, radiance attenuation coefficient at the biomass peak and maximum oxygen penetration depth in the BGC cultures of *Prosthecochloris aestuarii* as a function of light used during the culturing.

Culturing light conditions	Biofilm location (mm below the surface)	Max. density depth (mm below the surface)	Max. radiance attenuation coefficient (mm^{-1})	Max. Oxygen penetration depth (mm below the surface)	Reference
Vis.	1.5-2.5	2.1	9.3	1.2	Present study
Vis.+NIR	2.2-3.5	2.9	9.1	2.2	Pringault <i>et al.</i> 1998

attenuated to less than $0.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NIR at the bottom of the biofilm. The 430-700 nm photon flux density was $47.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top of the biofilm, which was attenuated to 19 and $4.25 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the biomass peak and the bottom of the biofilm, respectively. Under full light conditions, infrared light was added but visible light was slightly reduced, probably because the presence of the hot mirror filter improves the collimation of the light beam. The total photon flux density (430-850 nm) was approximately twice as high as during the development of the biofilm (visible light). Attenuation of photon flux density in the biofilm was more than tenfold for both the visible (430-700 nm) and NIR (700-850 nm) wavelengths.

At the top of the biofilm, the maximum sulfide oxidation rates were quite similar (approximately $0.4 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{s}^{-1}$), both under visible light exposure and full light conditions. The maximal sulfide photo-oxidation rate peaked at 2.1 mm under culture conditions, while under full light conditions, the activity increased within the sediment until reaching a maximum value ($3.51 \text{ nmol sulfide cm}^{-3} \text{s}^{-1}$) at the bottom of the biofilm. At the bottom of the biofilm, the addition of NIR thus boosted the sulfide photo-oxidation rate nine-fold with respect to the culture conditions.

Discussion

Impact of light quality and quantity on the biofilm

Light conditions in deep submerged sediments may be critical for green sulfur bacteria, because the water column absorbs the NIR wavelengths, while the remaining shorter wavelengths are strongly attenuated in sediments. In this study, we have simulated these conditions by culturing *P. aestuarii* strain 2404 in the BGC under visible light, with a very minor proportion of NIR light ($517 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 430-700 nm and $37 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 700-850 nm) at the sediment surface. After 5 weeks incubation under these conditions, a biofilm of *P. aestuarii* developed between 1.5 and 2.5 mm depth with a maximum density at 2.1 mm depth (see table III. 2). This was below the maximum penetration depth of oxygen, i.e. 1.2 mm, because of the strictly anaerobic nature of the organism. The energy transfer pathway of green sulfur bacteria is described by the following chain : carotenoid \rightarrow BChl *c* \rightarrow BChl *a* _{baseplate} \rightarrow BChl *a* _{cytoplasmic membrane} \rightarrow BChl *a* _{reaction center}

(Blankenship *et al.* 1995). The spectral composition of the light used for the culturing implied that photons were mainly harvested by the BChl *c* Soret band and carotenoids.

Pringault *et al.* (1998) have previously studied a biofilm of *P. aestuarii* cultured in the BGC under visible light supplemented with infrared (800 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 430-700 nm and 2200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 700-900 nm) at the sediment surface. Under those conditions light was predominantly harvested by the Q_y absorption band of BChl *c* and the biofilm was located deeper in the sediment, i.e. between 2.2 and 3.5 mm depth. The biomass peak was observed at 2.9 mm depth, and the oxygen penetration depth was 2.2 mm. The depth distribution of *P. aestuarii* reflects where favorable growth conditions have occurred during the culturing period since this species cannot adapt its position by migration. A series of causal relationships explains why the anaerobic biofilm of *P. aestuarii* developed at a shallower depth (about 1 mm closer to the sediment surface) in the current study (table III. 2), whereas the radiance attenuation coefficient at the biomass peak were identical in both studies (9.3 mm^{-1} and 9.1 mm^{-1} in the present and the previous study, respectively). The use of lower light consisting mainly of visible wavelengths did not allow green sulfur bacteria to develop deep in the sediment. As a consequence, more sulfide diffused higher in the sediment which enhanced the abiotic reaction of oxygen and sulfide. This resulted in a shallower oxygen penetration depth. Hence, *P. aestuarii* developed at shallower depths in the sediment where light conditions were appropriate.

The pigment composition of the biofilm of *P. aestuarii* strain CE 2404 was compared with liquid batch cultures of the organism cultured under green light (see Figure III. 2). Light conditions within the biofilm ranged from 53 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top to 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the bottom. This entire range of light intensities was studied in the batch cultures. All liquid batch cultures showed a predominance of the second BChl *c* homologue, while the pigment distribution in the biofilm showed a predominance of the third slightly more hydrophobic BChl *c* homologue (*c3*). It thus appears that BChl *c* homologue distribution of the biofilm cannot be explained by the light quantity but rather other factors. Other studies have, however, clearly reported that more hydrophobic BChl *c* homologues are synthesized at low light intensities (Borrego *et al.* 1995).

Photosynthetic sulfide oxidation during transient states.

Short light / dark cycles showed small changes in sulfide profiles upon exposure to visible light which was used during the culturing period. This contrasted with full light

conditions (culture conditions amended with NIR light) where strong variations were observed during the short light / dark cycles (Figure III. 3). The submaximal sulfide photo-oxidation rates at time 0 (Figure III. 4) can be explained by the predominance of cyclic electron transport needed for the re-establishment of the proton motive force (Pringault *et al.* 1999). The maximal activity at 10 min was five times higher upon exposure to full light conditions compared to visible light (Figure III. 4), showing that sulfide photo-oxidation was boosted by NIR light at this depth. Under full light conditions, it was observed that the sulfide photo-oxidation rate decreased drastically after 10 min. To study this phenomenon, we have plotted the sulfide photo-oxidation rate against the remaining free sulfide concentration in Figure III. 5.

The sulfide photo-oxidation rate and the sulfide concentration in the biofilm represent a trajectory and the latter variable has not been fixed by the experimenter (Figure III. 5). We think that the apparent inhibition of the sulfide photo-oxidation rate above 200 μM is a time-dependent effect and related to competition between cyclic and linear electron transport during the early transient state upon the transition from dark to light. *P. aestuarii* cannot generate energy by respiration or fermentation in the dark. Hence, the energy charge of the cell and the proton motive force across its membranes would decrease during the dark period. Upon the shift to light, cyclic electron transport would be favored with respect to linear electron flow until the proton motive force attains a certain threshold level (cf. Pringault *et al.* 1999). Indeed the long-term growth of Chlorobiaceae in liquid cultures is less susceptible to high sulfide concentrations; i.e. typical inhibition constants for sulfide (K_i) in Chlorobiaceae are in the mM range, which is much higher than suggested from the short-term experiment described in Figure III. 5 (Van Gernerden and Mas 1995). The apparent inhibition at 200 μM is thus not a property inherent to the organism but appears as a result of temporal and spatial phenomena in the biofilm. In addition, Figure III. 5 strongly suggests that after 10 min, sulfide photo-oxidation was limited by the sulfide concentration. The relationship was almost linear up to 100 μM . However, this kinetics showed a much lower affinity than can be expected according to Monod kinetics observed in liquid chemostat cultures (Van Gernerden 1984; Van Gernerden and Mas 1995). This indicates that in the biofilm, the oxidation kinetics are subjected to diffusional limitations at the micro-scale (Koch 1990). Under visible light, a low rate of sulfide photo-oxidation was maintained roughly constant during the remaining 20 min of light exposure. This can be explained by the fact that sulfide concentration remained high at the end of the 30 min of light exposure (approximately 1 mM, see Figure III. 3).

Vertical gradients of limiting conditions through the biofilm

Under the culture conditions during the light periods, the scalar irradiance in the biofilm ranged from 53 to 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at the top and bottom, respectively. It was 21.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 2.1 mm, the depth of the biomass peak (see Table III. 1). The maximum sulfide oxidation rate was similar at the bottom and the top, while it was twice higher at the biomass peak. The addition of NIR light resulted approximately in a doubling of scalar irradiance. At the biomass peak and at the bottom, the maximum sulfide oxidation rate was boosted indicating that light was limiting at these depths under culture conditions. In contrast, at the top of the biofilm, addition of NIR light did not affect the maximum sulfide photo-oxidation rate. Thus, light was not limiting at the top and sulfide oxidation was inhibited by another factor. Potential inhibiting factors may include toxic products of the abiotic reaction of oxygen and sulfide diffusing downwards from the oxygen-sulfide coexistence zone (top mm). A known toxic product for the growth of *P. aestuarii* is sulfite (Guyoneaud 1996).

The stimulation of sulfide photo-oxidation rate by NIR light was particularly strong at the bottom of the biofilm. The almost 10 fold increase corresponds to the 10 fold increase of NIR, indicating a very efficient transfer of energy from the Q_y band of BChl *c* to the reaction center. Under full light conditions, the total sulfide photo-oxidation rate was even higher at the bottom of the biofilm than at the biomass peak. This corroborates the potential for photosynthetic growth deeper in the sediment when NIR is added.

By comparison, in the biofilm of *P. aestuarii* cultured in the BGC under full light conditions by Pringault *et al.* (1998), it appeared that the sulfide photo-oxidation rate was limited by the diffusive flux of sulfide rather than by the photon flux density. Their approach consisted of studying the biofilm as a whole, which did not allow to detect depth variation of limiting factors in the biofilm. For the whole community it was shown that the sulfide oxidation was saturated at a scalar irradiance (430-830 nm) above 2 to 4 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ using NIR-rich light. In view of their data, it is surprising that in the current study we unequivocally show that at the biomass peak (2.1 mm), the sulfide photo-oxidation was clearly limited by a photon flux density of 21.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. This would suggest that either the energy from the shorter wavelengths is harvested with a low efficiency, or that the energy transfer from the carotenoids and the Soret band of the BChl *c* molecules to the reaction centers is less efficient than transfer from the Q_y band. However, this latter

hypothesis is not supported by fluorescence excitation spectra of green sulfur bacteria which indicate a high transfer of excitation from carotenoids or the Soret band of the BChl *c* to the Q_y band (Blankenship *et al.* 1995). Therefore, it is likely that energy from shorter wavelengths is harvested with a low efficiency. Nevertheless, the current study does not allow precise quantification of the quantum efficiency, which is needed to study this hypothesis.

Ecological aspects

In this study we have simulated critical light conditions for green sulfur bacteria that exist in submerged sandy sediments where NIR is filtered out by a significant water column (5-10 meters). The simulated conditions are typical for low turbidity water at several meters depth. This study shows that a potential niche exists for *P. aestuarii* in such environments. Nevertheless, particular conditions including a low oxygen penetration depth and high sulfide availability in the sediment are required. In clear sandy sediments that have attenuation coefficients for NIR of 1 to 1.5 mm⁻¹, for an isotropic light field the photon flux density is attenuated by 64 to 88 % per millimeter, respectively. Hence, the trade-off of oxygen penetration in sediments is a decrease of light available for growth of the strictly anaerobic benthic green sulfur bacteria. The situation is even worse in muddy or silty sediments, where light attenuation is much higher (2-3 mm⁻¹).

The combination of a low turbidity in the water column and sandy sediments with low oxygen concentration and high sulfide availability are rarely found in natural environments. Therefore, benthic biofilms of *P. aestuarii* are seldom in deep aquatic habitats. Nevertheless, such conditions are found occasionally in lake and coastal lagoon environments. In this respect, dense populations of *P. aestuarii* have been described in sediments covered with a 1 m water column in the Etang du Prévost (Guyoneaud *et al.* 1998).

Acknowledgements

Astrid Massé would like to thank Prof. Bo Barker Jørgensen and Dr. Dirk de Beer for the opportunity to stay at the Max-Planck Institut für Marine Mikrobiologie (Bremen, Germany) during a 3 month period. Special thanks are due to Gaby Eickert, Anja Eggers and Vera Hübner for the microsensor construction. Astrid Massé was supported by a grant from

the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) and a PhD fellowship from the Région Aquitaine. HPLC equipment has been acquired with the support of the Région Aquitaine. Olivier Pringault was supported by a Postdoctoral stipend from the Max Planck Society. Part of this study was financed by the European Union Biotechnology Programme through the project MICROMAT, microbial diversity of microbial mats in Antarctica (contract N°BIO4-CT98-0040).

References

- Blankenship RE, Olson JM and Miller M (1995) Antenna Complexes from Green Photosynthetic Bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT and Bauer CE (eds) *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, pp 399--435. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London
- Borrego CM and Garcia-Gil LJ (1994) Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth Res* 41: 157--163
- Borrego CM and Garcia-Gil LJ (1995) Rearrangement of light harvesting bacteriochlorophyll homologues as a response of green sulfur bacteria to low light intensities. *Photosynth Res* 45: 21--30
- De Wit R (2000) Sulfide-Containing Environments. In: *Encyclopedia of Microbiology*, Volume 4, 2nd edition, pp 478--494. Academic Press
- Epping E, Khalili A and Thar R (1999) Photosynthesis and the dynamics of oxygen consumption in a microbial mat as calculated from transient oxygen microprofiles. *Limnol Oceanogr* 44 (8): 1936--1948
- Guyoneaud R (1996) Etude écologique, physiologique et systématique des communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques en milieu lagunaire méditerranéen et atlantique. PhD thesis n°1387, Université Bordeaux I, France
- Guyoneaud R, de Wit R, Matheron R and Caumette P (1998) Impact of macroalgal dredging on dystrophic crises and phototrophic bacterial blooms (red waters) in brackish coastal lagoon. *Oceanologica Acta* 21 (4): 551--561
- Jeroschewski P, Steuckart C and Kühl M (1997) An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Anal Chem* 24: 4351--4357

- Kirk JTO (1994) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Koch AL (1990) Diffusion; The Crucial Process in Many Aspects of the Biology of Bacteria. In: Marshall KC (ed) *Advances in Microbial Ecology Volume 11*, pp 37--70. Plenum Press, New York and London
- Kühl M and Jørgensen BB (1992) Spectral light measurements in microbenthic phototrophic communities with a fiber-optic microprobe coupled to a sensitive diode array detector. *Limnol Oceanogr* 37 (8): 1813--1823
- Lemaire E, Abril G, de Wit R and Etcheber H (2002) Distribution of phytoplankton pigments in nine European estuaries and implications for an estuarine typology. *Biogeochemistry*, under press
- Millero FJ (1986) The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar Chem* 18: 121--147
- Pierson BK, Oesterle A and Murphy GL (1987) Pigments, light penetration, and photosynthetic activity in the multi-layered microbial mats of Great Sippewissett Salt Marsh, Massachusetts. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 365--376
- Pierson BK, Sands VM, and Frederick JL (1990) Spectral irradiance and distribution of pigments in a highly layered marine microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 56: 2327--2340
- Pringault O, de Wit R and Caumette P (1996) A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 20: 237--250
- Pringault O, Kühl M, de Wit R and Caumette P (1998) Growth of green sulphur bacteria in experimental benthic oxygen, sulphide, pH and light gradients. *Microbiology* 144: 1051--1061
- Pringault O, Epping E, Guyoneaud R, Khalili A and Kühl M (1999) Dynamics of anoxygenic photosynthesis in an experimental green sulphur bacteria biofilm. *Environ Microbiol* 1: 295--307
- Revsbech NP and Jørgensen BB (1986) Micro-electrodes: Their use in microbial ecology. *Adv Microb Ecol* 9: 293--352
- Revsbech NP (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol Oceanogr* 34: 472--476
- Van Gemerden H (1984) The sulfide affinity of phototrophic bacteria in relation to the location of elemental sulfur. *Arch Microbiol* 139: 289--294

- Van Gemerden H and Mas J (1995) Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT and Bauer CE (eds) Advances in photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, pp 49--85. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London
- Vila X and Abella CA (1994) Effects of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynth Res* 41: 53--65

**Experimental Study of Interactions between Purple and Green Sulfur
Bacteria in Sandy Sediments exposed to Illumination deprived
of Near Infrared.**

Astrid Massé ¹, Olivier Pringault ^{1,2,3} & Rutger de Wit ^{1,*}

¹*Laboratoire d'Océanographie Biologique, CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2 rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France*

²*Max-Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Microsensor Group, Celsiusstraße 1, D-28359 Bremen, Germany*

³*Present address: Centre IRD de Nouméa. BP A5, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia*

**Correspondence to : R. de Wit, Laboratoire d'Océanographie Biologique, CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2 rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France*

Phone: 33 (5) 56 22 39 09; Fax: 33 (5) 56 83 51 04

E-mail : r.de-wit@epoc.u-bordeaux.fr

Abstract

Biofilms of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404, the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 and a mixed culture of both have been cultured in sand within counter gradients of oxygen and sulfide. The artificial sediments were exposed to illumination deprived of near infrared light (NIR), using a 16 hours visible light/8 hours dark regime, to simulate the critical light conditions in submerged aquatic sediments. We studied the effect of these light conditions on the metabolism of and the interactions between both species, by comparing the single species biofilms with the mixed biofilm. Photosynthesis rates of *P. aestuarii* were shown to be highly limited by the imposed light conditions, because the sulfide photo-oxidation rates were strongly stimulated when NIR was added. *T. roseopersicina* performed both aerobic chemosynthesis and photosynthesis, but the photosynthesis rates were low and poorly stimulated by addition of NIR. This species decreased the penetration depth of oxygen by about 1 mm by actively respiring oxygen. This way, the strict anaerobe *P. aestuarii* was able to grow closer to the surface in the mixed culture. As a result, *P. aestuarii* benefited from the presence of *T. roseopersicina* in the mixed culture, which was reflected by an increase of the biomass density. In contrast, the density of the latter species was poorly affected by the interaction. Both species coexisted in the same depth layer in the mixed culture and the ecological and evolutionary implications of coexistence are discussed.

Abbreviations : BChl – Bacteriochlorophyll; BGC – Benthic Gradient Chamber; Cbt – Chlorobactene; L/D – Light / Dark; NIR - near infrared; Okn – Okenone; Vis. – Visible

Résumé

Des biofilms axéniques des bactéries sulfureuses verte *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 et pourpre *Thiocapsa roseopersicina* 5811, ainsi qu'une culture mixte des deux espèces ont été obtenus par culture dans un sédiment soumis à des gradients d'oxygène et de sulfure. Les sédiments artificiels étaient exposés à une illumination dépourvue de longueurs d'ondes proches de l'infrarouge (NIR), sous un régime 16 heures lumière / 8 heures obscurité simulant les conditions lumineuses critiques caractéristiques des sédiments profonds. Nous avons étudié l'effet de ces conditions lumineuses à la fois sur le métabolisme et sur les interactions entre ces deux espèces, en comparant les biofilms axéniques à la culture mixte. Dans le cas de *P. aestuarii*, l'addition de rayons infrarouge a induit une forte augmentation des taux de photo-oxidation du sulfure stipulant que les taux de photosynthèse chez *P. aestuarii* sont fortement limités par les conditions lumineuses imposées pour la culture. *T. roseopersicina* a pu croître à la fois par chimiosynthèse aérobie et photosynthèse, mais les taux de photosynthèse étaient très faibles et faiblement stimulés par l'addition de rayons infrarouge. En respirant l'oxygène, *T. roseopersicina* diminue la profondeur de pénétration de l'oxygène de 1 mm. Ainsi *P. aestuarii*, espèce strictement anaérobie a pu se développer plus près de la surface dans la culture mixte. Finalement, dans la culture mixte, la densité de biomasse de *P. aestuarii* était supérieure à celle obtenue en culture axénique indiquant que *P. aestuarii* a bénéficié de la présence de *T. roseopersicina* en surface. Au contraire, la densité de *T. roseopersicina* n'était que très peu affectée par l'interaction. Dans la culture mixte, les deux espèces coexistaient à la même profondeur et les implications écologiques et évolutionnistes de cette coexistence sont discutées dans ce travail.

Introduction

Green Sulfur Bacteria (GSB) and Purple Sulfur Bacteria (PSB) coexist in different aquatic ecosystems. The interactions between both groups, and how these are influenced by the light conditions, have been studied in detail for the pelagic environment both by field studies and laboratory experimentation (Bustillos-Guzman *et al.*, 2000; Garcia-Gil *et al.*, 1999; Montesinos *et al.*, 1983; van Gemerden & Mas, 1995; Vila *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 1996; Vila *et al.*, 1994). Purple and Green Sulfur Bacteria also proliferate in the upper layers of different shallow aquatic sediments in photosynthetic biofilms or microbial mats (Caumette *et al.*, 1994; Madigan *et al.*, 2000; Pierson *et al.*, 1990; Pierson *et al.*, 1987; Stal *et al.*, 1985).

It has been postulated that shallow benthic environments were the sites where life emerged on earth and where photosynthesis evolved early in evolutionary history within biofilms and stratified communities fossilized as stromatolites (Pierson & Olson, 1989; Schopf & Walter, 1982). GSB and most PSB have Bacteriochlorophyll (BChl) *a* in their reaction center, but these are different types. GSB possess a type 1 reaction center (RC1) with a low-potential iron-sulfur center as the electron acceptor, while PSB possess a type 2 reaction center (RC2) with a higher potential quinone as the electron acceptor. GSB and PSB have very different light-harvesting systems. Most PSB contain BChl *a* as antenna molecules associated with a whole range of different carotenoids. GSB contain chlorosomes with BChl *c* or *d* associated with chlorobactene (Blankenship *et al.*, 1995; Caple *et al.*, 1978). The brown-colored pelagic GSB species are distinct because they contain Bchle associated with isorenieratene.

The light conditions in sediments are shaped by scattering and strong attenuation of UV and shorter visible wavelengths, and are therefore proportionally enriched in red and NIR light below the surface (Hoffmann, 1949; Kühl & Jørgensen, 1992; 17, Pierson *et al.*, 1990; Pierson *et al.*, 1987). Therefore, the evolution of the different BChl's, which present a whole suite of complementary *in vivo* absorption peaks in the NIR, has been related to the evolutionary pressures in early benthic environments driving a niche differentiation for the use of NIR (Pierson & Olson, 1989). In contrast, submerged environments have a very different light quality. Water strongly absorbs NIR light, e.g., a 1 m water column attenuates NIR light of wavelengths above 740 nm to below 1 % of the surface value (Kirk, 1994). Lower wavelengths are poorly absorbed by pure water. But, in addition, most natural waters contain dissolved organic compounds and nitrate that very strongly absorb blue and UV wavelengths (Kirk, 1994). Thus, immersion has a profound effect on the light conditions in benthic microbial mats. In shallow benthic habitats, PSB and GSB are often exposed to

fluctuations of water depth. Therefore, it is relevant for ecological and evolutionary studies to find out how water column height puts constraints on growth of benthic PSB and GSB and how it affects the interaction among representative species.

The aim of the present study was to find out how NIR depleted light affects the interactions between PSB and GSB in spatially ordered benthic sulfureta. We have chosen an experimental approach by growing representative species on sand in a Gradient Culture Chamber that we have previously called Benthic Gradient Chamber (Pringault *et al.*, 1996). This device allows to culture a biofilm of phototrophic sulfur bacteria in experimentally controlled light and solute (i.e. oxygen and sulfide) gradients and provides a more realistic simulation of benthic growth than classical liquid cultures. A detailed analysis using microsensors allows to study the depth distribution of the bacterial populations in the sediment and to quantify the rates of sulfide oxidation and oxygen consumption and their variations in time and space (Pringault *et al.*, 1996; 1999b). *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (DSM 5653) (Caumette *et al.*, 1985) have been selected for this study as representatives of GSB and PSB, respectively. Both species are characteristic for benthic environments. Interactions between species can be inferred by comparing the biofilms in the mixed culture with the respective axenic cultures using the same incubation conditions.

Methods

Bacterial strains

Two strains of phototrophic microorganisms, the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (DSM 5653) (Caumette *et al.*, 1985), were cultured in the Benthic Gradient Chamber, under a 16 hours / 8 hours light / dark regime of visible light. Both strains from the culture collection of the Laboratory of Biological Oceanography (University of Bordeaux I, Arcachon, France), are nonmotile.

Prosthecochloris aestuarii strain CE 2404 is a spherical green sulfur bacterium with extrusions (prosthecae) that contains Bacteriochlorophyll *c* (BChl *c*) and carotenoids from the chlorobactene series as the major pigments. *P. aestuarii* also contains Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*), which is associated to the baseplate of the chlorosome

(Imhoff, 1995), the FMO protein and located in the reaction center. This strictly anaerobic strain grows photolithotrophically with H₂S and elemental sulfur as electron donors. Thiosulfate and sulfite are not used as electron donors, and the latter compound is even inhibitory for growth (Imhoff, 1995).

Thiocapsa roseopersicina strain 5811 (DSM 5653), was originally isolated from the Etang du Prévost (S. France) and has been designated as *Thiocapsa roseopersicina forma specialis*, because it contains okenone instead of spirilloxanthin as the major carotenoid (Caumette *et al.*, 1985). We have chosen this okenone-containing strain which is better adapted to growth below a water column than the spirilloxanthin-containing strain used in previous studies under visible + NIR light (Pringault *et al.*, 1999b). Cultures of the strain are purple-violet in colour and exhibit *in vivo* absorption maxima at 370 nm (BChl. *a*- Soret band), 520 nm (okenone) and 830 nm (LH2 - BChl *a*). The cells are spherical (1.2 - 3 µm diameter) and able to grow photolithotrophically using sulfide, elemental sulfur, thiosulfate and sulfite as electron donor (Madigan *et al.*, 2000). Facultatively, it can also grow as a chemolithoautotroph with oxygen as the electron acceptor and sulfide, thiosulfate or elemental sulfur as the electron donor (Imhoff, 1995). Hence, apart from carotenoid pigmentation and *in vivo* absorption spectrum, it shares the major phenotypic traits with other *T. roseopersicina* isolates. A recent phylogenetic study based on 16S RNA sequence analyses showed that the strain belongs to the so-called *Thiocapsa roseopersicina* group. Within this group, it clustered very closely together with several different spirilloxanthin-containing strains originally described as *T. roseopersicina*, although the phylogenetic distance to the type strain (DSM 217) was somewhat larger (Guyoneaud *et al.*, 1998).

Culture conditions

P. aestuarii CE 2404 and *T. roseopersicina* 5811 were cultured in artificial fine-sand sediments using the Benthic Gradient Chamber (BGC) described by Pringault *et al.* (1996). Three different cultures were studied, i.e. (P) *P. aestuarii* CE 2404 alone, (T) *T. roseopersicina* 5811 alone and (PT) a mixture of *P. aestuarii* CE 2404 and *T. roseopersicina* 5811. The BGC is composed of an artificial sediment core (50 mm internal diameter, 45 mm length) sandwiched between an upper oxic and a lower anoxic chamber of 2000 ml and 3500 ml, respectively (Pringault *et al.*, 1996). The top cm of the sediment cores of cultures (P) and (T) were inoculated with 15 ml from liquid batch cultures in exponential phase of *P. aestuarii* strain CE 2404 and *T. roseopersicina* strain 5811, respectively. For culture (PT) a mixture of

both axenic batch cultures was prepared under aseptic conditions and 15 ml of this mixture was transferred to the top cm of the artificial sediment core. The culturing period was 5 weeks and exactly the same for the three different cultures. However, the different cultures were set up sequentially, with a one week interval between successive cultures, in order to allow the time necessary for the detailed microsensor analyses and experiments with the biofilms after the five week incubation period (see below). The temperature was maintained at 20°C during the 5 weeks of culturing.

The BGC was illuminated from above by a collimated light beam of an incandescent lamp (100W, E27, Sylvania reflector) using a 16 hours / 8 hours light / dark regime. A Hot Mirror Filter (775FW82-50, Andover Corporation, USA) was placed in the light-path (below the collimator) to filter out the infrared wavelengths. Compared with full light conditions, the Hot Mirror Filter did not affect the light transmission for the visible. Under light conditions used for the culturing, the downwelling irradiance at the sediment surface was ca. 170 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 430-700 nm and ca. 10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for the NIR part (700-900 nm).

Microsensor analyses

Microelectrodes measurements of solute concentrations

Oxygen concentration measurements were performed using a Clark-type oxygen microelectrode with a guard cathode (Revsbech, 1989). Dissolved hydrogen sulfide concentrations were measured using an amperometric H_2S microelectrode (Jeroschewski *et al.*, 1997). We checked that the pH remained constant throughout the biofilm after replacement of the upper medium with a buffer (see below) by profiling with a pH glass microelectrode (Revsbech & Jørgensen, 1986), which was connected to a high-impedance millivoltmeter with a calomel electrode as a reference. Total dissolved sulfide ($\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$ and S^{2-}) was calculated from the dissolved H_2S concentration and the pH value (Pringault *et al.*, 1998). The three microelectrodes were mounted on the micro-manipulator (Märzhauser, Germany), at the same horizontal level; the distance between them was less than 2 mm.

Microscale light measurements

Light measurements were performed with fibre-optic microprobes (scalar irradiance and field radiance microprobes) connected to a cooled optical spectrophotometer (O-SMA, Kühl & Jørgensen, 1992). The scalar irradiance was used to estimate the photon flux density available for photosynthesis, which was measured both for NIR-deprived light (culturing

conditions) and full light conditions. The backscattered radiance was used to determine the depth distribution of major photo-pigments. The latter was measured under full light conditions. During full light conditions, the Hot Mirror was removed for the period of time requested for the measurements. The measurement and calibration procedures have been described by Pringault *et al.* (1998). The maxima of scalar irradiance and backscattered radiance were aligned with the sediment surface. The partial attenuation coefficient (K_D) for backscattered field radiance was defined as the rate of change of ln-transformed radiance values with depth (see Kirk, 1994, Pringault *et al.*, 1998 for details).

Estimation of fluxes and rates

The 5-week cultivation period following inoculation allowed the formation of the different biofilms growing in the sand. After this period, the light conditions and L/D regimen were maintained as used for the culturing. The depth distribution of metabolic processes and fluxes were inferred from steady state oxygen and sulfide profiles performed under light conditions used during the culturing, at the end of the 16 h light and 8 h dark periods, respectively. Secondly, short L/D cycles of 30 min L / 30 min D were applied to estimate the sulfide photo-oxidation activity (see below). NIR depleted light (same as used for culturing) was compared with full light conditions (visible amended with NIR). Finally, the biofilm was harvested by subcoring (cores of 24 mm diameter). The cores were frozen and stored at -80°C for further analyses of pigment contents.

We studied sulfide dynamics upon a shift from dark to light during short light-dark cycles (30 min light / 30 min dark). The L/D cycle had been designed in such a way that the sulfide concentration at the end of the dark and the beginning of the light period were similar. The H_2S concentration and pH were monitored at a given depth during these L/D cycles and the procedure was repeated sequentially at different depths until the entire zone of interest had been scanned. From these cycles, it was possible to estimate the sulfide photo-oxidation activity in the biofilm. The procedure has been previously described (Massé *et al.*, in press; Pringault *et al.*, 1999a). We compared the effect of NIR-deprived light (culture conditions) with full light conditions on the sulfide photo-oxidation activity. During full light conditions, the Hot Mirror was removed for the period of time requested for the measurements.

Prior to the measurements with the microsensors, we opened the BGC and replaced the upper oxic medium by a KH_2PO_4 buffer (100 mM, pH 7.2) amended with 30 g l^{-1} NaCl. This resulted in a constant pH throughout the biofilms which improved the accuracy for the calculations of total dissolved sulfide concentrations ($\text{H}_2\text{S} + \text{HS}^-$ and S^{2-}), afterwards referred

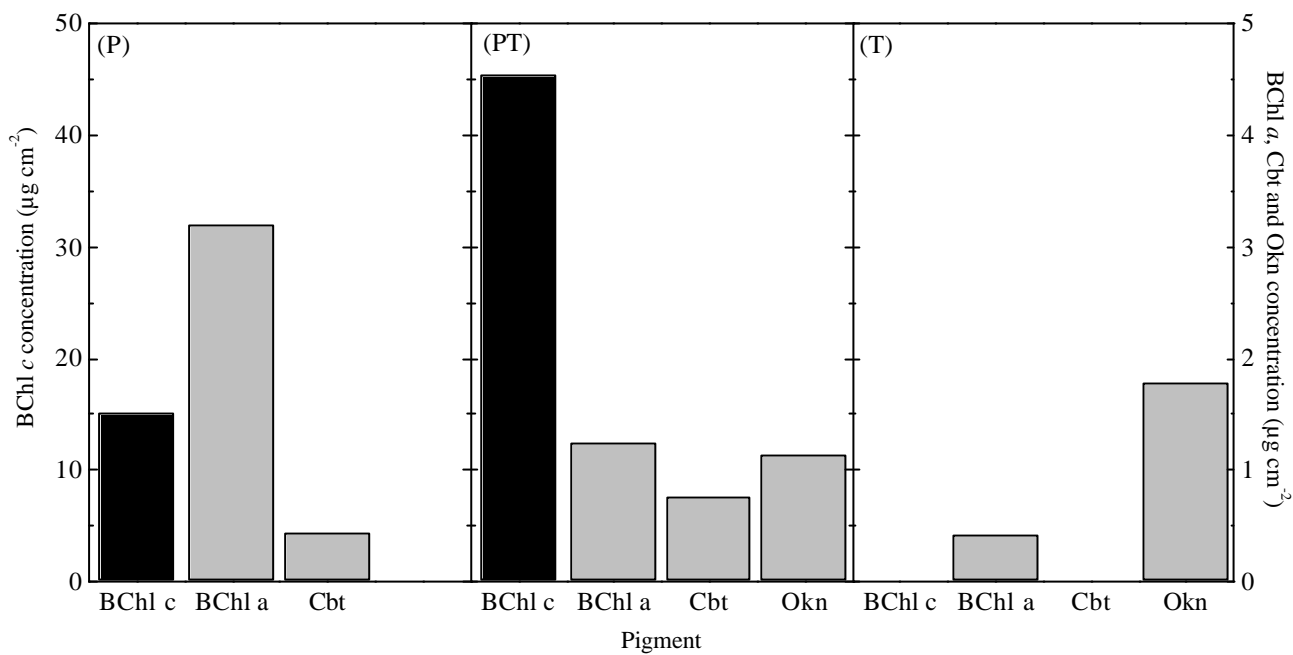


Figure III. 6: Comparison of the BChl *c* (black color), BChl *a*, Cbt and Okn (gray color) concentrations (µg cm⁻²) in the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (P), the axenic biofilm of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (T), and the mixed culture of both bacteria (PT). Note the different scale for BChl *c* concentration.

to as sulfide. The optical and chemical microsensors were introduced from the side under 150° zenith angle relative to the incident light in order to prevent shading of the measurement spots. All measurements were made on the same 1 cm² surface of the sand core with a vertical resolution of 100 µm.

Pigment analysis

The pigment composition of the different biofilms were studied by Liquid Chromatography (HPLC). The sediment core with the biofilm was extracted from the BGC, frozen, and stored at -80°C. The superficial sediment comprising the biofilm (1.5 cm width) was homogenized. Pigments were extracted in 5 ml acetone (100%, 4°C) by sonicating for 30 seconds under N₂ flush and stored at -30°C for 3 hours. Extracts were separated from sediment by centrifugation (x 3000 g, 10 min, Seli, France). The material was extracted three times, pooled and stored overnight under N₂ flush at -80°C. The Liquid Chromatography System used in this study was described by Lemaire *et al.* (in press). Since authentic standards were not available, pigment contents were quantified from peak area assuming an extinction coefficient of 86 l g⁻¹ cm⁻¹ at 440 nm for BChl *c* (Stal *et al.*, 1984), 84.1 l g⁻¹ cm⁻¹ at 770 nm for BChl *a* (Fenchel, 1998), 304 l g⁻¹ cm⁻¹ at 440 nm for chlorobactene (Foppen, 1971), and 232 l g⁻¹ cm⁻¹ at 440 nm for okenone (Foppen, 1971).

Results

Description of the biofilms obtained after 5 weeks of culturing in the BGC

Bacterial density

The pigment contents of the different biofilm cultures are shown in Fig. III. 6. The BChl *c* concentration in the mixed biofilm (PT) was 3 fold higher than in the axenic *P. aestuarii* biofilm (P), i.e. 45.4 and 15.1 µg cm⁻² for PT and P, respectively. Also chlorobactene was higher in the mixed PT biofilm than in the P biofilm, but the difference

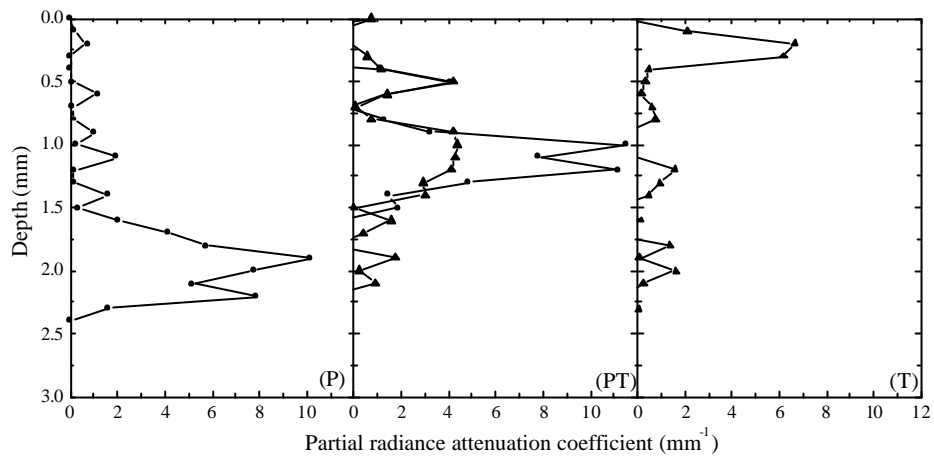


Figure III. 7: Comparison of the depth distribution of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 in the axenic biofilm of *P. aestuarii* (P), *T. roseopersicina* (T) and the mixed culture of both bacteria (PT). The depth distribution has been inferred from the partial radiance attenuation for 750 nm (●) and 830 nm (▲) (see text), as proxy for the depth distribution of *P. aestuarii* and *T. roseopersicina*, respectively.

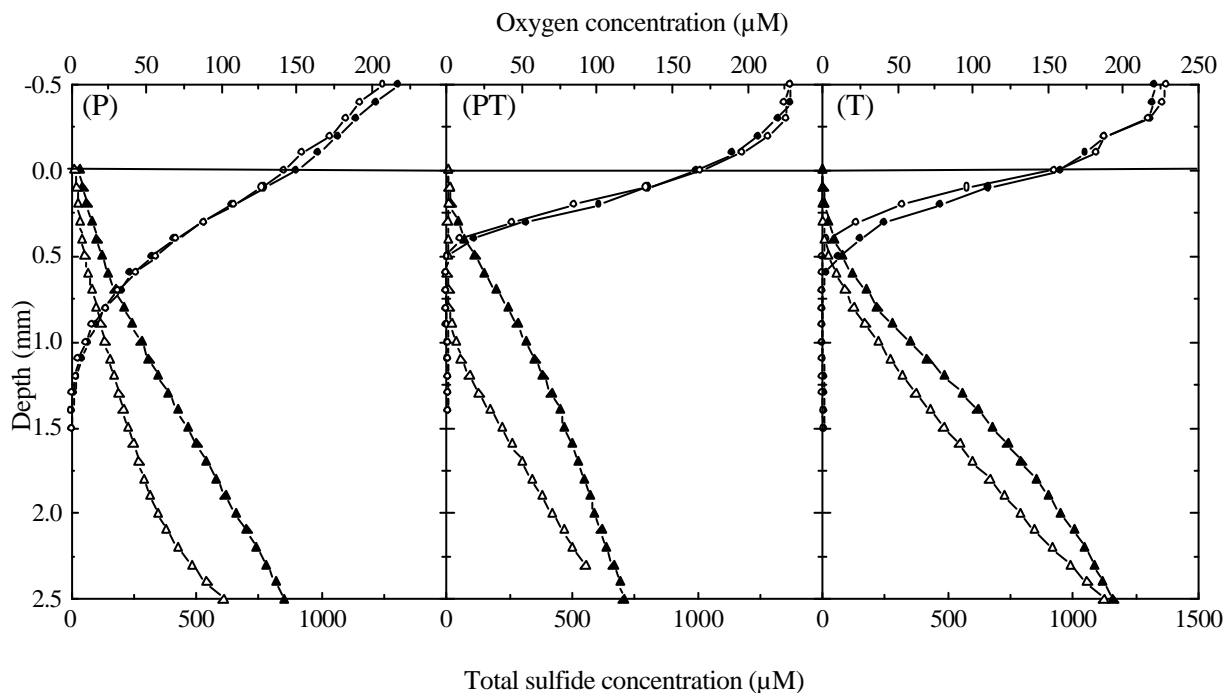


Figure III. 8: Comparison of sulfide (up triangle) and oxygen (circle) profiles in the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (P), in the axenic biofilm of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (T) and the mixed culture of both bacteria (PT), cultured in the BGC under visible light (L/D = 16 h / 8 h). (▲) and (●) represent situation at the end of the 8 h dark period; (△) and (○) represent situation at the end of the 16 h light period.

was smaller, namely twofold (0.75 and 0.42 $\mu\text{g cm}^{-2}$, for PT and P, respectively). Both pigments indicated that the density of *P. aestuarii* was more important in the biofilm when this species was cultured together with *T. roseopersicina* (PT) than when cultured alone (P). In contrast, for *T. roseopersicina* 5811, the okenone content in the mixed PT biofilm was smaller than that found in the T biofilm, i.e. 1.1 and 1.78 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively. BChl *a* is synthesized both by *T. roseopersicina* 5811 and *P. aestuarii*. In the mixed culture PT, the content of this compound was 1.24 $\mu\text{g cm}^{-2}$, which, surprisingly, was lower than in the axenic culture of *P. aestuarii* (3.19 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in P), but as expected higher than the BChl *a* concentration in the axenic culture of *T. roseopersicina* 5811 (0.41 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in T). The BChl *c* to BChl *a* molar ratio in the P culture was ca. 50:1, which is low for *P. aestuarii* for which typical ratios of 50:1 have been observed in batch cultures (Massé *et al.*, unpublished data). Assuming that for *T. roseopersicina* 5811 the ratio of BChl *a* to okenone was the same in the T and PT cultures, we can calculate by subtraction the amount of BChl *a* attributed to *P. aestuarii* in the PT culture. This indicates that the BChl *c* to BChl *a* molar ratio was close to 50:1 for *P. aestuarii* in the PT culture.

Depth distribution of bacteria in the biofilms

In order to characterize the depth distribution of the bacterial strains in the sediments, we measured the depth profiles of backscattered radiance and calculated their partial attenuation coefficients, i.e. K_D , for photons of 750 nm and 830 nm. 750 nm and 830 nm correspond to the *in vivo* absorption maxima of the Q_y -band of BChl *c* of *P. aestuarii* and the BChl *a*-containing LH2-complex of *T. roseopersicina* 5811, respectively. The abiotic attenuation by the sand, measured in an unpopulated artificial sediment core, was approximately 1 mm^{-1} . This background value has been subtracted from the values measured in the different biofilm cultures and the partial attenuation coefficients are shown in Figure III. 7. Hence, the partial attenuation coefficient at 750 nm can be used as a proxy for *P. aestuarii* and its corresponding value at 830 nm can be used as a proxy for *T. roseopersicina* 5811 densities.

In the axenic culture of *P. aestuarii* (Fig. III. 7 P), the biofilm was located between 1.5 and 2.5 mm depth, with a density peak at 2 mm depth (i.e. $K_D = 10 \text{ mm}^{-1}$). In the axenic culture of *T. roseopersicina* 5811 (Fig. III. 7 T), the biofilm was located between 0 and 1 mm depth with a density peak at 0.2 mm depth (i.e. $K_D = 6.5 \text{ mm}^{-1}$). In the mixed culture PT, pigmented cells of both bacteria coexisted in the same depth horizon of the sediment core, i.e.

Table III. 3: Zero-order reaction rate and integrated rate of O₂ respiration and H₂S oxidation, and oxygen and sulfide diffusive fluxes in the axenic biofilm (T) of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 and the mixed culture (PT) of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 and *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404.

Biofilm	Substrate	Reaction zone (cm)	Zero-order rate ($\mu\text{mol cm}^{-3} \text{h}^{-1}$)	Integrated rate in reaction zone ($\mu\text{mol cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Diffusive flux toward reaction zone ($\mu\text{mol cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)
(T) <i>T. roseopersicina</i>	Oxygen	0-0.07	1.84	0.129	0.140
	End of Dark Sulfide	0-0.09	1.47	0.132	0.126
(T) <i>T. roseopersicina</i>	Oxygen	0-0.06	3.05	0.183	0.138
	End of Light Sulfide	0.02-0.09	1.46	0.102	0.099
(PT) Coculture	Oxygen	0-0.06	1.67	0.084	0.109
	End of Dark Sulfide	0-0.04	1.87	0.075	0.069
(PT) Coculture	Oxygen	0-0.06	1.54	0.092	0.093
	End of Light Sulfide	0.06-0.13	1.21	0.085	0.077

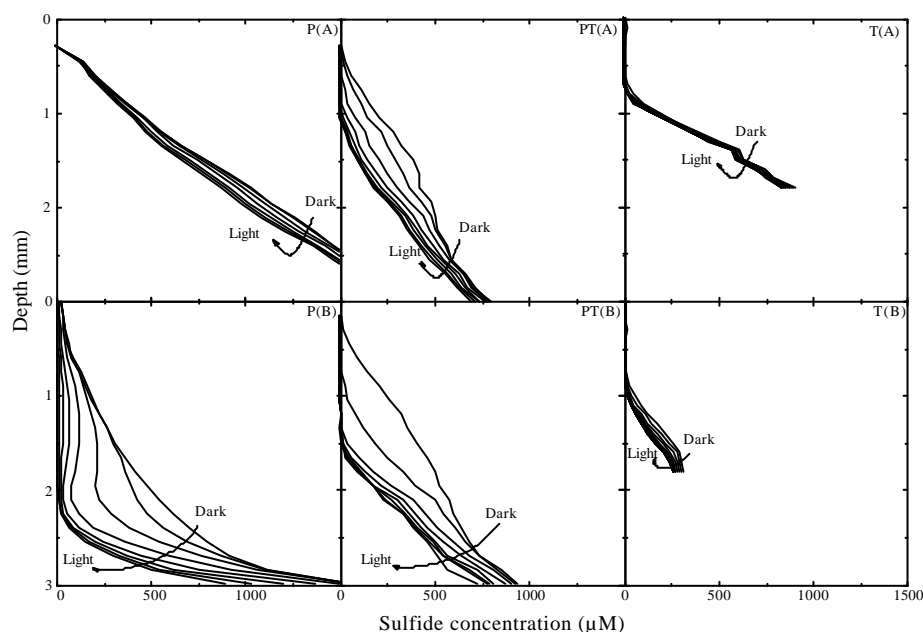


Figure III. 9: Effect of short L/D cycles (30 min L / 30 min D) on sulfide profiles in the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (left panel, P), *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (right panel, T) and the mixed culture of both bacteria (medium panel, PT). The transient profiles have been obtained from sequential monitoring at different depths (see Methods). The profiles are given for selected depths and represent the transition from dark to light. The time interval between two successive profiles is 2 minutes. (A): visible light (culture conditions); (B): full light conditions (visible enriched with NIR light).

from 0.25 to 2 mm depth (Fig. III. 7 PT). A first attenuation peak reflecting the photopigments BChl *c* and BChl *a* was observed at ca. 0.5 mm depth. A second one was observed deeper in the biofilm at ca. 1 mm depth, with a K_D of 11.5 mm^{-1} and 4.4 mm^{-1} , for 750 nm and 830 nm, respectively.

Steady state profiles of O_2 and H_2S measured in the different biofilms at the end of the 8h dark and 16 h light periods, respectively, are depicted in Figure III. 8. In all cultures, the oxygen profiles remained rather constant throughout a diel cycle, because only minor differences were observed between oxygen profiles measured at the end of the light and dark periods, respectively. Oxygen penetration depth in the sediment was 0.5 to 0.6 mm in the T and PT cultures, while this compound penetrated down to 1.3 - 1.5 mm depth into the sediments of the P culture. Thus, the presence of *T. roseopersicina* 5811 in the biofilm resulted in a much shallower oxygen penetration depth. This latter bacterium is capable to respire oxygen and grow as a facultative microaerobic chemolithotrophe (Caumette *et al.*, 1985).

In the mixed culture (PT), oxygen and sulfide coexisted between 0.3 and 0.5 mm depth at the end of the dark period. The concentrations of both coexisting compounds were low. This reflects a high turn-over rate for these compounds inferring that a chemosynthetic reaction was taking place. This was attributed to *T. roseopersicina* 5811 and was confirmed by the respiration rate of ca. $0.13 \mu\text{mol O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ measured at the end of the dark period, in the reaction zone of the mixed culture PT (see Table III. 3). The stoichiometry indicates incomplete oxidation of sulfide. During the light period, the sulfide front shifted downwards to 0.8 mm depth due to photosynthetic sulfide oxidation by the phototrophic bacteria. As a result, at the end of the light period, H_2S and O_2 did not coexist and the depth zone between 0.6 and 0.8 mm depth was characterized by the absence of oxygen and sulfide.

In the axenic culture of *P. aestuarii* (P), oxygen and sulfide coexisted from the surface down to 1.3 mm depth at the end of the dark period. In contrast with the PT culture, the oxygen coexistence zone was thus six times broader and both compounds coexisted in higher concentrations. This reflected a much lower turn-over rate of both compounds that can be explained by abiotic reaction kinetics (Millero, 1986). During the light period, the coexistence front of oxygen and sulfide shifted downwards to 1.5 mm depth. Concentrations of sulfide increased within the biofilm of *P. aestuarii* that extended down to 2.5 mm depth. In the axenic culture of *T. roseopersicina* 5811 (T), a coexistence zone of oxygen and sulfide was persistent but shifted during the diel cycle. The oxygen profiles were similar at the end of the dark and light periods and the maximum oxygen penetration depth was located at 0.6 mm

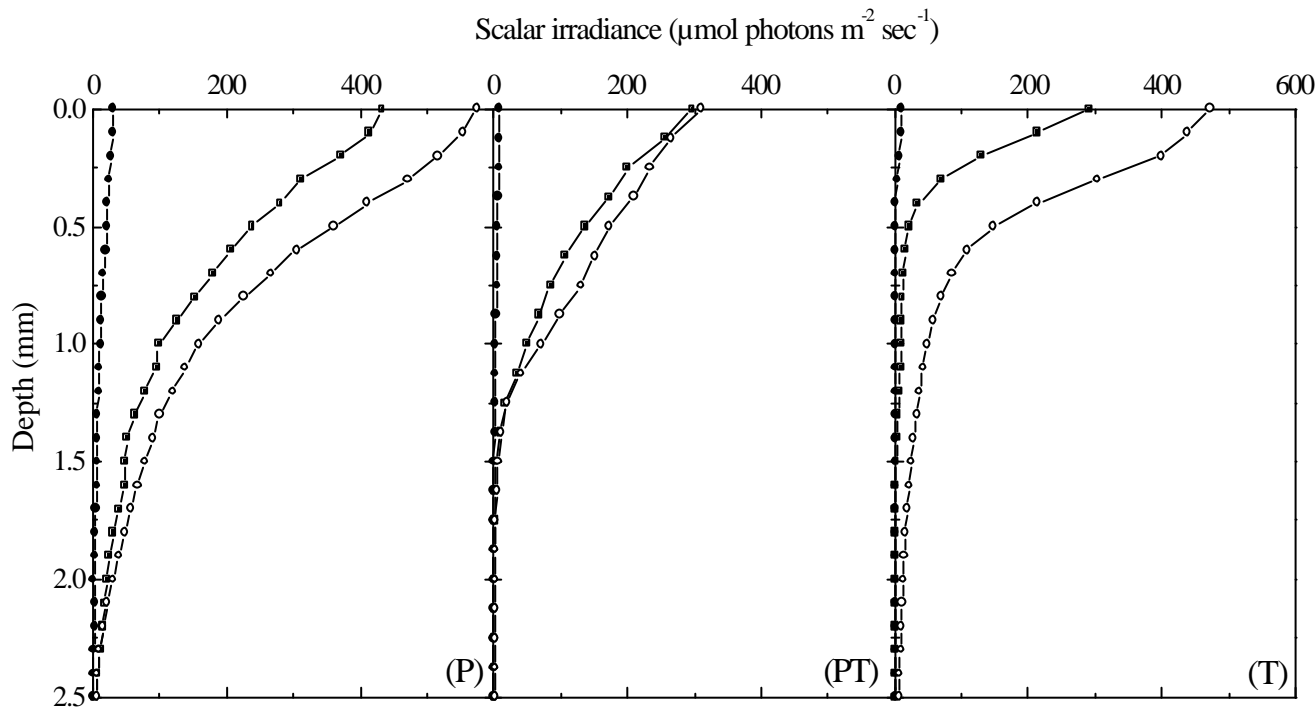


Figure III. 10: Distribution of PAR (■) and NIR (●) radiation ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) measured under culture conditions, and NIR radiation (○) measured under full light conditions at different depths within the axenic biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 (P), the axenic biofilm of *Thiocapsa roseopersicina* strain 5811 (T) and the mixed biofilm of both bacteria (PT).

depth. At the end of the dark period, the sulfide front reached 0.25 mm depth whereas it shifted downwards to 0.5 mm during the light period. The high turn-over rates of oxygen and sulfide measured at the end of the dark period in the reaction zones, i.e. $0.129 \mu\text{mol O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ and $0.132 \mu\text{mol sulfide cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, indicated chemosynthesis by *T. roseopersicina* 5811, pointing to an incomplete oxidation of sulfide (see Table III. 3). The minor shift of the sulfide profile during the light period indicated that photosynthetic activity of *T. roseopersicina* 5811 was low.

Analyses of sulfide oxidation within the biofilms measured during short L/D cycles

In order to estimate the effect of light quality on the sulfide photo-oxidation, series of transient profiles were performed under NIR deprived light as used during the culturing and light amended with NIR (see Methods). These transient profiles are depicted in Figure III. 9. Under NIR-deprived light, the transient profiles indicated that the sulfide photo-oxidation rates in both axenic cultures P and T were lower than the sulfide photo-oxidation rates in the mixed culture PT. In contrast, when NIR light was added, the most pronounced sulfide dynamics were observed in the axenic culture of *P. aestuarii* (P) where the average sulfide photo-oxidation rate was five fold higher than under NIR-deprived light (6.37 and $1.22 \mu\text{mol sulfide cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively). For the mixed culture (PT), sulfide dynamics were also enhanced (1.73 and $2.99 \mu\text{mol sulfide cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ under NIR-deprived and full light conditions, respectively), but this was not so pronounced as in the P culture. The smallest effect of NIR addition on sulfide dynamics was observed in the axenic culture of the purple strain *T. roseopersicina* 5811 (T), inferring that light quantity and quality had little effect on the sulfide photo-oxidation activity: the activity was still very low and almost equal to the activity measured under the culturing light conditions. This indicates that sulfide photo-oxidation in the axenic culture of *T. roseopersicina* 5811 occurred but at very low rates and was poorly affected by the light quality.

Effect of the different biofilms on the light availability within the sand

Figure III. 10 shows the values of the scalar irradiance as a function of depth in the sediment for the different biofilm cultures. The values have been integrated for PAR (actually

from 430-700 nm) and for NIR (700- 850 nm). The results for PAR are presented only for NIR-deprived light conditions whereas the results of NIR are presented for both NIR-deprived light and full light conditions. In the *P. aestuarii* (P) culture, where the biofilm was located more than 1 mm below the surface, the sediment was very reflective similarly as wet sterile sand (Kühl & Jørgensen, 1994) and scalar irradiance at the sediment surface was more than 150 % higher than the incident downwelling irradiance (461 and 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively). This effect was less pronounced in the T and PT cultures. Moreover, the scalar and the incident downwelling irradiance measured at the sediment surface of the T culture were similar to those measured at the sediment surface of the PT culture. Attenuation of scalar irradiance was strongest in the PT and T cultures. The strongest attenuation was between 0-0.5 mm in the T culture and between 0.5 and 1.5 mm in the PT culture, which corresponds to the location of the pigment-containing biofilms in both cultures (cf. Fig. III. 7). Light penetration was the deepest in the P culture sediments. The attenuation of scalar irradiance was particularly low between 0 and 1.5 mm depth, because in this area the sand was not populated by *P. aestuarii* (cf. Fig. III. 7). There was, however, a marked increase of scalar irradiance attenuation between 1.5 and 2.5 mm depth in the biofilm of *P. aestuarii*. The light conditions at the peak of the *P. aestuarii* biomass were remarkably similar in the PT and P cultures, i.e. 17.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR + 1.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NIR at 1 mm depth and 20.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR + 1.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NIR at 2 mm depth in the PT and P cultures, respectively.

Discussion

Interactions between *P. aestuarii* and *T. roseopersicina*

In the present work, we experimentally simulated the constraining light conditions, i.e. depletion of NIR light, which exist in submerged sediment, and we studied the effect of these drastic conditions on the interactions between purple and green sulfur bacteria in benthic biofilms. Using these conditions, we found significant higher biomarker pigment concentrations specific for *P. aestuarii* in the PT than in the P culture (see Fig. III. 6), indicating that *P. aestuarii* clearly benefited from the presence of *T. roseopersicina* 5811 in the artificial sulfidic sandy sediment. When cultured together, both species have to compete for light and sulfide as energy source and electron donor, respectively. The response of both bacteria to this competition will depend on their metabolism. *P. aestuarii* is an obligate anaerobe with photolithotrophy as the only option for growth. This species depends therefore

on light (quality and quantity), H₂S conditions and absence of oxygen. As a consequence, this bacterium only developed below the maximum oxygen penetration depth, and where light was still available for photosynthesis. In contrast, *T. roseopersicina* is a facultative aerobe and a versatile organism that is capable of photolithotrophy and chemolithotrophy. In the dark, this species shifts immediately to chemosynthesis when oxygen and a reduced sulfur compound are present. Oxygen inhibits photosynthetic pigment synthesis, but not directly photosynthesis, in this species (de Wit & van Gemerden, 1987;1990). Therefore, oxic-anoxic alternations have a great impact on its physiology. It has been shown that the regular occurrence of short anoxic periods allow this species to synthesize sufficient bacteriochlorophyll to maintain photosynthesis during the oxic light periods (de Wit & van Gemerden, 1990), but photosynthesis and chemosynthesis may occur simultaneously in the light when the bacteriochlorophyll content is very low (Schaub *et al.*, 1994). From steady state profiles and short light / dark shift experiments performed in the axenic (T) culture, we infer that chemolithotrophy by *T. roseopersicina* was predominant close to the surface, while the biofilm also showed a low rate of photosynthesis during the light period (see Figs. III. 8 and III. 9 and Table III. 3).

When cultured together with *P. aestuarii*, we can assume that *T. roseopersicina* escapes the competition for light by switching from photolithotrophy to chemolithotrophy, thus competing for sulfide only. In addition, light use in the visible is complementary for both strains, because the absorption maxima are 440 and 520 nm for *P. aestuarii* and *T. roseopersicina* 5811, respectively. The okenone content was only slightly lower in the PT than in the T culture, indicating that competition with *P. aestuarii* for sulfide exerted virtually no impact on *T. roseopersicina*. In a previous study, we showed that the use of NIR deprived light on an axenic biofilm culture of *P. aestuarii* in the benthic gradient chamber resulted in limitation by light rather than by sulfide (Massé *et al.*, in press). Therefore, competition for sulfide between *P. aestuarii* and *T. roseopersicina* was of minor importance under the studied light conditions.

The main effect of *T. roseopersicina* 5811 in the PT culture was to decrease the oxygen penetration depth by respiring oxygen for chemosynthesis; i.e., the oxygen penetration depths were 1.5 and 0.5-0.6 mm depth in the P and PT cultures, respectively. As a result, *P. aestuarii* could grow closer to the surface in the PT than in the P culture where it initially benefited from higher scalar irradiance values. Thus, oxygen respiration by *T. roseopersicina* 5811 measured in the PT culture; i.e. 0.13 $\mu\text{mol O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (see Table III. 3), exerted a positive interaction effect on *P. aestuarii* in the spatially ordered photosynthetic

biofilm. After a five week incubation period, this was reflected by the depth distribution of pigmented cells in the respective biofilms (see Fig. III. 7). By that period, the light conditions at the peak of the *P. aestuarii* biomass were remarkably similar, i.e. $17.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR + $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NIR at 1 mm depth and $20.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR + $1.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ NIR at 2 mm depth in the PT and P cultures, respectively (see Fig. III. 10). Apparently, there was also a slightly negative effect of *T. roseopersicina* 5811 on *P. aestuarii*, because the presence of the former species contributed to enhanced light attenuation in the top mm and a modification of the optical properties of the sediment (compare cultures T and PT with P in Fig. III. 10) which decreased light availability for *P. aestuarii*. However, as mentioned above, light use of the visible light is largely complementary for these bacteria. More importantly, oxygen consumption by *T. roseopersicina* in the upper layers of the PT sediment allowed *P. aestuarii* to grow closer to the surface. Hence, the impact of *T. roseopersicina* 5811 on the optical properties of the sediment, which appeared slightly negative for *P. aestuarii*, was largely overruled by the positive interaction due to oxygen respiration by *T. roseopersicina* 5811.

Critical evaluation of backscattered irradiance attenuation as a proxy for pigment distribution

Backscattered radiance profiles at wavelengths corresponding to *in vivo* absorption by photosynthetic pigments have been commonly used to trace photosynthetic micro-organisms at high spatial resolution in biofilms and microbial mats (Fenchel & Kühl, 2000; Kühl & Fenchel, 2000; Kühl & Jørgensen, 1992; 1994; Pringault *et al.*, 1999a, 1999b). This approach implies that the radiance attenuation coefficient can be used as a proxy for the density of the pigment-containing cells (Pringault *et al.*, 1998). In this study, we measured pigment contents of the total biofilm by HPLC, which gives us the opportunity to critically compare the extracted pigment content with the depth integrated bacterial biomass estimated from the corresponding radiance attenuation coefficient. In this specific case, such a comparison is facilitated by the fact that all pigments, except Bacteriochlorophyll *a*, originate from a single bacterial strain.

The increase of the concentration of BChl *c* and chlorobactene in the PT culture compared to the P culture (see Fig. III. 6), indicate that the density of the green bacterium was higher when the latter was cultivated in coculture with *T. roseopersicina*. This was confirmed by an increase of the depth-integrated partial attenuation coefficient specific for BChl *c*, i.e. $\int K_D \times dz = 0.50$ and $\int K_D \times dz = 0.45$ (*z* corresponds to the sediment depth), measured in the PT and the P cultures, respectively. However, it is surprising that the increase of the depth-

integrated partial attenuation coefficient in the PT culture did not match the increase of the BChl *c* concentration. Thus, it seems that the partial attenuation coefficient of 750 nm radiance in the PT culture was low when considering the BChl *c* content. This points to an underestimation by the methodological procedures or / and a mechanism previously observed and described as the package effect. Harimoto et al (1999) measured very high concentration of chlorophyll *a* but low chlorophyll-*a*-specific absorption spectra in phytoplankton cells of central North Pacific water. They attributed this observation to the package effect (Amesz *et al.*, 1961), i.e. the large phytoplankton cells were heavily loaded with chlorophyll in combination with low concentrations of photo-protection carotenoids. Another study (Aguilera *et al.*, 1999), related about similar package effects when different ultraviolet radiations were used to grow the red alga *Porphyra umbilicalis*. They showed that under specific UV conditions, the pigment peak absorption decreased whereas the pigment concentrations did not vary significantly. They explained their observations by invoking possible rearrangement of the pigments in the thylakoids of the red alga. The package effect can be due to spatial arrangements of pigments within cells, but probably also by spatial arrangements of cells in a densely packed biofilm. In the present study, we can suppose that this phenomenon was particularly important in the PT culture where very high concentration of BChl *c* were measured. In addition, a possible underestimation of the radiance attenuation coefficient is not unlikely for the lower part of the biofilm, where this value is calculated from backscattered radiance values that are close to the detection limit. For example, in the P culture, it was thus inferred that biomass was extremely low below 2.4 mm depth. This was surprising, because photosynthesis was detected at 2.5 mm depth, particularly when NIR was added. However, in general, in axenic biofilms there is good agreement between the depth of the biomass peak and the maximal photosynthetic activity inferred from the different methods (this study, Massé *et al.*, in press, Pringault *et al.*, 1998, 1999a).

For *T. roseopersicina* 5811, the comparison between the okenone content and the K_D at 520 nm was problematic, because the backscattered radiance profile for this wavelength was noisy. Therefore, we choose to trace the depth distribution of this strain from the K_D at 830 nm, which is the maximum of its LH2 complexes. Only in the T culture, this value can be directly compared to its BChl *a* content, because in the PT culture BChl *a* also included contributions from *P. aestuarii* (with an evaluated contribution of $0.98 \mu\text{g BChl } a \text{ cm}^{-2}$ see Results). In the PT culture, the okenone concentration was slightly lower than in the T culture (i.e. 1.1 and $1.8 \mu\text{g cm}^{-2}$, in the PT and the T culture, respectively). The depth-integrated partial attenuation coefficient at 830 nm measured in the PT culture was similar to the depth-

integrated partial attenuation coefficient measured in the T culture, i.e. $\int K_D \times dz = 0.24$ and $\int K_D \times dz = 0.20$ in the PT and the T cultures, respectively. In the PT culture, the K_D peaked between 0.9 and 1.3 mm depth both for 750 and 830 nm, indicating that *P. aestuarii* clearly coexisted with *T. roseopersicina* 5811 in this depth layer.

In conclusion, it appears that while backscattered radiance attenuation is a powerful method to detect the depth horizon of the biomass peak of phototrophic micro-organisms in a biofilm, its conversion to pigment content or biomass is problematic. Hence, future studies requiring high spatial resolution biomass depth profiles in biofilms need to include other techniques like confocal laser microscopy.

Ecological aspects and evolutionary implications.

The present work shows the complexity of interaction in spatially ordered microbial ecosystems as photosynthetic biofilms and microbial mats that cannot be easily studied by classical liquid batch cultures. We reported that *P. aestuarii* and *T. roseopersicina* 5811 formed biofilms in artificial sulfidic sandy sediments under critical light conditions (NIR-deprived light), which are characteristic for submerged sediment. In the mixed PT culture, both strains coexisted in the same depth horizon (0.8 – 1.4 mm), and *P. aestuarii* benefited from the interaction with *T. roseopersicina*. Natural environments are often exposed to fluctuating water levels and consequently to very variable light conditions. We have studied the effect of the sudden addition of NIR light on photosynthesis (Fig. III. 9b) and on the light distribution (Fig. III. 10) in the biofilms that were pregrown under NIR deprived light. It was shown that the photosynthesis rates were strongly enhanced in the P and PT cultures, but only to a lesser extent in the T culture. This indicates that *P. aestuarii* was strongly limited by light under the culture conditions (see also Massé *et al.*, in press), while this was less stringent for *T. roseopersicina*. Thus, *P. aestuarii* may immediately take advantage of improved light conditions when water height decreases or sediments emerge. However, during such an event the biofilm can shift from light limited to limited by the diffusive sulfide supply and competition for sulfide becomes thus important. Indeed, single-species and mixed biofilms of *P. aestuarii* and *T. roseopersicina* grown under NIR rich light were limited by the diffusive sulfide supply rather than by light (Pringault *et al.*, 1998; 1999b). Under these conditions, *P. aestuarii* biomass was reduced due to competition with *T. roseopersicina*. Collectively, these studies show that green and purple sulfur bacteria may coexist in benthic biofilms under different light conditions and that distribution of green sulfur bacteria is constrained by the oxygen penetration depth. The backscattered radiance profiles indicated that purple and green

sulfur bacteria coexisted in the same depth layer in both mixed biofilms cultured so far (this study, Pringault *et al.*, 1999b). The possibility of a coexistence zone of purple and green sulfur bacteria without any clear vertical stratification in the sediment, appears in disagreement with usual observations and statements reporting that PSB and GSB communities are well stratified in benthic environments (Caumette, 1989; Nicholson *et al.*, 1987; Pierson *et al.*, 1987; 1990). Recently, a study combining microscope spectrometry and fluorometry was performed to identify the vertical distribution of phototrophs in an artificial cyanobacterial mat (Kühl & Fenchel, 2000). It revealed a coexistence layer of BChl *c* and BChl *a* between 3.8 and 4.0 mm depth, below the oxygenic zone, thus indicating the presence of green and purple sulfur bacteria in the same depth horizon. Thus, we can assume that purple and green sulfur bacteria may coexist in benthic environments. This coexistence was probably even more widespread early in evolutionary history, when occurrence of green sulfur bacteria was less constrained due to absence of oxygen. It has been postulated that shallow benthic sediments were sites where life emerged on earth (Schopf & Walter, 1982). A recent study of comparative genomics of different genes involved in photosynthesis, showed that while the RC2-containing purple sulfur bacteria were the most ancient group, also the RC1-containing anoxygenic phototrophs (Heliobacteria and green sulfur bacteria) preceded oxygenic phototrophs. A heterologous fusion model has been put forward to explain the evolution of oxygenic photosynthesis based on recruitment of genes from the different groups of anoxygenic phototrophs (Xiong *et al.*, 1998). The coexistence of purple and green sulfur bacteria in microbial mats and photosynthetic biofilms, as we observe in our experimental studies, becomes very interesting in the light of this hypothesis. Conceivably, the coexistence of high densities of purple and green sulfur bacteria in the same depth layer of photosynthetic biofilms provide a very likely occasion for the lateral gene transfer as invoked by the heterologous fusion model.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) and a PhD fellowship from the Aquitaine Council. HPLC equipment has been acquired with the support of the Aquitaine Council. Olivier Pringault was supported by a Postdoctoral stipend from the Max Planck Society. Part of this study was

financed by the European Union Biotechnology Program through the project MICROMAT, microbial diversity of microbial mats in Antarctica (contract N°BIO4-CT98-0040).

Astrid Massé would like to thank Prof. Bo Barker Jørgensen and Dr. Dirk de Beer for the opportunity to stay at the Max-Planck Institut für Marine Mikrobiologie (Bremen, Germany) during a 3 month period. Special thanks are due to Gaby Eickert, Anja Eggers, Vera Hübner and Mathilde Schapira for the microsensor construction and the pigment extraction work, respectively.

References

- Aguilera, J., C. Jiménez, F.L. Figueroa, M. Lebert, and D-P. Häder. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 48: 75-82.
- Amesz, J., L.N.M. Duysens, and D.C. Brandt. 1961. Methods for measuring and correcting the absorption spectrum of scattering suspensions. *J. Theoret. Biol.* 1: 59-74.
- Blankenship, R.E., J.M. Olson, and M. Miller. 1995. Antenna complexes from green photosynthetic bacteria, p. 399-435. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Bustillos- Guzmán, J., D. López-cortés, F. Hernandez, and I. Murillo. 2000. Pigment signatures with an anoxic coastal zone: Bahia Concepcion, Gulf of California. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249: 77-88.
- Caple, M.B., H. Chow, and C.E. Strouse. 1978. Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria. *J. Biol. Chem.* 253 (19): 6730-6737.
- Caumette, P., R. Matheron, N. Raymond , and J.C. Relexans. 1994. Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Giraud, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 273-286.
- Caumette, P. 1989. Ecology and general physiology of anoxygenic phototrophic bacteria in benthic environments, p. 283-304. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds) *Microbial Mats; physiological ecology of benthic microbial communities*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Caumette, P., C. Schmidt, H. Biebl, and N. Pfennig. 1985. Characterization of a *Thiocapsa* strain containing okenone as major carotenoid. *System. Appl. Microbiol.* 6: 132-136.
- De Wit, R., and H. van Gemerden. 1990. Growth and metabolism of the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* under combined light/dark and oxic/anoxic regimens. *Arch. Microbiol.* 154: 459-464.
- De Wit, R., and H. van Gemerden. 1987. Chemolithotrophic growth of the phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 117-126.
- Fenchel, T., and M. Kühl. 2000. Artificial cyanobacterial mats: Growth, structure and vertical zonation patterns. *Microb. Ecol.* 40: 85-93.
- Fenchel, T. 1998. Formation of laminated microbial mats in the absence of benthic fauna. *Aquat. Microb. Ecol.* 14: 235-240.
- Foppen, F. H. 1971. Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* 14: 133-298.
- Garcia-Gil, L. J., E. Vicente, A. Camacho, C. M. Borrego, X. Vila, X. P. Cristina, and J. Rodriguez-Gonzalez. 1999. Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in lake 'El Tobar' (Cuenca, Spain). *Aquat. Microbiol. Ecol.* 20: 299-303.
- Guyoneaud, R., J. Süling, R. Petri, R. Matheron, P. Caumette, N. Pfennig, and J.F. Imhoff. 1998. Taxonomic rearrangements of the genera *Thiocapsa* and *Amoebobacter* on the basis of 165S rDNA sequence analyses, and description of *Thiolamprovum* gen.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 48: 957-964.
- Harimoto, T., J. Ishizaka, and R. Tsuda. 1999. Latitudinal and vertical distribution of phytoplankton absorption spectra in the central North Pacific during spring 1994. *Journal of Oceanography* 55 (6): 667-679.
- Hoffmann, C. 1949. Über die Durchlässigkeit dünner Sandschichten für Licht. *Planta*, Bd. 36: 48-56.
- Imhoff, J. F. 1995. Taxonomy and Physiology of phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria, p 1-15. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Jeroschewski, P., C. Steuckart, and M. Kühl. 1997. An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Anal. Chem.* 24: 4351-4357.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

- Kühl, M., and T. Fenchel. 2000. Bio-optical characteristics and the vertical distribution of photosynthetic pigments and photosynthesis in an artificial cyanobacterial mat. *Microb. Ecol.* 40: 94-103.
- Kühl, M., and B.B. Jørgensen. 1994. The light field of microbenthic communities : Radiance distribution and microscale optics of sandy coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 39 (6): 1368-1398.
- Kühl, M., and B.B. Jørgensen. 1994. Light penetration and light intensity in sandy marine sediments measured with irradiance and scalar irradiance fiber-optic microprobes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105: 139-148.
- Kühl, M., and B. B. Jørgensen. 1992. Spectral light measurements in microbenthic phototrophic communities with a fiber-optic microprobe coupled to a sensitive diode array detector. *Limnol. Oceanogr.* 37 (8): 1813-1823.
- Lemaire, E., G. Abril, R. de Wit, and H. Etcheber. Distribution of phytoplankton pigments in nine European estuaries and implications for an estuarine typology. *Biogeochemistry*, in press.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2000. Prokaryotic Diversity: Bacteria, p 454-544. *In* M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker (eds) *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, Ninth Edition.
- Massé, A., O. Pringault, and R. de Wit. Effect of light quality on sulfide photo-oxidation and growth in an artificial biofilm of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. *Photosyn. Res.*, in press.
- Millero, F.J. 1986. The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar. Chem.* 18: 121-147.
- Montesinos, E., R. Guerrero, C. 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 (5): 1007-1116.
- Nicholson, J.A., J.F. Stolz, and B.K. Pierson. 1987. Structure of microbial mat at Great Sippewissett Marsh, Cape Cod, Massachusetts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 343-364.
- 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 (8): 2327-2340.
- Pierson, B.K., and J.M. Olson. 1989. Evolution of photosynthesis in anoxygenic photosynthetic prokaryotes, p. 402-427. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds)

- Microbial Mats; Physiological ecology of benthic microbial communities. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pierson, B.K., A. Oesterle, and G.L., Murphy. 1987. Pigments, light penetration, and photosynthesis activity in the multi-layered microbial mats of Great Sippewissett Salt Marsh, Massachussets. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 365-376.
- Pringault, O., E. Epping, R. Guyoneaud, A. Khalili, and M. Kühl. 1999a. Dynamics of anoxygenic photosynthesis in an experimental green sulfur bacteria biofilm. Environ. Microbiol. 1: 295-307.
- Pringault, O., R. de Wit and, M. Kühl. 1999b. A microsensor study of the interaction between purple sulfur and green sulfur bacteria in experimental benthic gradients. Microbiol. Ecol. 37: 173-184.
- Pringault, O., M. Kühl, R. de Wit, and P. Caumette. 1998. Growth of green sulphur bacteria in experimental benthic oxygen, sulphide, pH and light gradients. Microbiology. 144: 1051-1061.
- Pringault, O., R. de Wit, and P. Caumette. 1996. A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. FEMS Microbiol. Ecol. 20: 237-250.
- Revsbech, N. P. 1989. An oxygen microsensor with a guard cathode. Limnol. Oceanogr. 34: 472-476.
- Revsbech, N. P., and B. B. Jørgensen. 1986. Micro-electrodes. Their use in microbial ecology. Adv. Microbiol. Ecol. 9: 293-352.
- Schaub, B.E.M., and H. van Gemerden. 1994. Simultaneous phototrophic and chemotrophic growth in the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* M1. FEMS Microbiol. Ecol. 13: 185-196.
- Schopf, J.W., and M.R. Walter. 1982. Origin and early evolution of cyanobacteria: The geological evidence, p. 543-564 In N.G. Carr and B.A. Whitton (eds), The Biology of the cyanobacteria. Blackwell, Oxford.
- Stal, L. J., H. van Gemerden, and W.E. Krumbein. 1985. Structure and development of a benthic marine microbial mat. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 111-125.
- Stal, L. J., H. van Gemerden, and W.E. Krumbein. 1984. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. J. Microbiol. Meth. 2: 295-306.
- van Gemerden, H., and J. Mas. 1995. Ecology of phototrophic sulfur bacteria, p. 49-85. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), Advances in Photosynthesis

- Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Vila, X., C.A. Abella, J.B. Figueras, and J.P. Hurley. 1998. Vertical models of phototrophic bacterial distribution in the metalimnetic microbial communities of several freshwater North-American kettle lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 287-299.
- Vila, X., M. Dokulil, L.J. Garcia-Gil, C.A. Abella, C.M. Borrego, and L. Bañeras. 1996. Composition and distribution of phototrophic bacterioplankton in the deep communities of several central European lakes: The role of light quality. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 48: 183-196.
- 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.
- Xiong, J., I. Kazuhito, and C.E. Bauer. 1998. Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14851-14856.

CONCLUSION

Au cours de ce chapitre expérimental, nous avons d'une part pu étudier l'effet de conditions drastiques, simulant les conditions lumineuses existant dans les systèmes sédimentaires submergés, sur la croissance et l'activité photosynthétique de la bactérie sulfureuse verte *Prosthecochloris aestuarii* en cultivant cette bactérie en chambre benthique, sous régime lumineux appauvri en rayons infrarouges (IR). Ce système de culture récemment mis au point, permet de simuler les conditions environnementales les plus proches de celles existant dans le milieu naturel. Bien qu'elle ait été cultivée pendant une période d'incubation de cinq semaines sous des conditions lumineuses critiques, la souche bactérienne a pu développer un biofilm dans le sédiment artificiel. Grâce aux mesures d'atténuation de la radiance, le maximum de biomasse bactérienne au sein du biofilm a pu être localisé à 2.1 mm, profondeur à laquelle les taux maximum de photo-oxydation du sulfure ont pu être mesurés. Des mesures de taux de photosynthèse réalisées en conditions de culture critiques (lumière visible) et conditions optimales (lumière enrichie en rayons IR) ont démontré l'impact de la qualité lumineuse sur ces processus. En effet, alors que les taux d'oxydation du sulfure restent faibles en conditions lumineuses de culture, la bactérie réagit à l'enrichissement en rayons IR, puisqu'on remarque une nette augmentation de ces taux. De plus les taux d'oxydation montrent une valeur maximale après une période d'exposition à la lumière de 10 minutes. Après ce laps de temps, les taux de photo-oxydation de sulfure diminuent, suite à l'épuisement du sulfure dans les couches profondes du sédiment.

La seconde partie de cette étude tendait à tester l'effet de ces mêmes conditions lumineuses critiques d'une part sur la croissance de la bactérie sulfureuse pourpre *Thiocapsa roseopersicina* en culture axénique, et d'autre part sur les interactions entre *P. aestuarii* et *T. roseopersicina* au sein d'une culture mixte. Nous avons mis en évidence la coexistence de ces deux bactéries au sein d'un même biofilm sédimentaire, à une même profondeur. La coexistence et l'interaction n'ont eu que très peu d'effet sur *T. roseopersicina*. Cet organisme, de part son métabolisme versatile, a pu s'affranchir des conditions lumineuses critiques en se développant par chimiotrophie et respirant l'oxygène présent dans les couches sédimentaires de surface. De ce fait, la profondeur de pénétration de l'oxygène était réduite, ce qui a permis à *P. aestuarii*, strictement anaérobie de bénéficier de cette interaction et de se développer plus proche de la surface, retrouvant ainsi des conditions lumineuses moins contraignantes.

CHAPITRE IV**ÉTUDE DE L'ADAPTATION PIGMENTAIRE DES
BACTERIES SULFUREUSES VERTES EN MILIEU PELAGIQUE**

Introduction _____ 104

Effet de l'intensité lumineuse sur la composition pigmentaire de deux bactéries sulfureuses vertes *Prosthecochloris aestuarii* et *Chlorobium phaeobacteroides* cultivées en lumière verte.

*Light intensity effects on the pigment composition of two green sulfur bacteria
Prosthecochloris aestuarii and Chlorobium phaeobacteroides grown under green
light.*

Massé A., R. Airs, B.J. Keely & R. de Wit, In preparation for Microbiology _____ 105

Conclusion _____ 121

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae sont capables de se développer mais aussi de coexister dans les sédiments d'écosystèmes aquatiques submergés, où les conditions lumineuses sont caractérisées par une faible intensité et un spectre lumineux très appauvri en rayons infrarouges (IR). Or, les conditions lumineuses à la surface des sédiments submergés sont très proches de celles retrouvées dans les couches d'eau les plus profondes. De ce fait, les Chlorobiaceae dont certains représentants existent à l'état pélagique dans les zones anoxiques, peuvent subir ces conditions lumineuses. De plus, il est important de noter qu'à certaines profondeurs, les conditions lumineuses sont constituées de lumière verte dont la composition spectrale ne varie pas. En outre, dans les couches les plus profondes de la colonne d'eau, c'est l'intensité lumineuse qui varie, et devient un paramètre influençant particulièrement la distribution des différentes communautés bactériennes (Borrego *et al.* 1993). D'ailleurs, plusieurs études réalisées sur les lacs ont montré que certaines espèces de Chlorobiaceae pélagiques adaptent leur composition pigmentaire en fonction du régime lumineux auquel elles sont soumises. Ces adaptations se traduisent notamment par une variation de leur contenu spécifique en allomères de bactériochlorophylle *c* ou *e*, pigment majeur chez ces micro-organismes (Borrego *et al.* 1995, 1997 ; Borrego, 1996). Aussi, après avoir étudié l'impact de la qualité lumineuse sur la croissance des Chlorobiaceae dans les systèmes sédimentaires (chapitre III), il nous a semblé judicieux d'étudier maintenant l'impact de variations d'intensités sur ces mêmes micro-organismes. Pour cela, deux espèces de Chlorobiaceae pélagiques dont la physiologie pigmentaire est aujourd'hui bien connue, ont été choisies. Il s'agit de *Prosthecochloris aestuarii* et de *Chlorobium phaeobacteroides*, dont la composition pigmentaire et l'adaptation chromatique ont fait l'objet de récentes études (Borrego *et al.* 1997 ; Airs *et al.* in press). Des cultures axéniques de chaque souche seront réalisées en milieu liquide et soumises à un même régime lumineux de lumière verte, à différentes intensités lumineuses. Les taux de croissance seront suivis par mesure journalière de la densité optique, traduisant l'évolution de la densité bactérienne dans le milieu. Enfin, grâce à l'émergence de nouvelles techniques d'analyse de chromatographie liquide (CLHP) et chromatographie liquide (CL-SM-SM) couplée à la spectrométrie de masse (Airs *et al.* 2000), il nous sera possible de déterminer la composition pigmentaire spécifique et d'analyser ses variations en fonction de l'intensité lumineuse testée.

Light intensity effects on the pigment composition of two green sulfur bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium phaeobacteroides* grown under green light.

Astrid Massé¹, Ruth Airs², Brendan J. Keely² and Rutger de Wit^{1,3}

¹*Laboratoire d'Océanographie Biologique, CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2 rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France*

²*Department of Chemistry, University of York, Heslington, York, U.K. YO10 5DD.*

³*Correspondence to : R. de Wit, Laboratoire d'Océanographie Biologique, CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2 rue du Professeur Jolyet, F-33120 Arcachon, France.*

Phone : 33 5 56 22 39 09 ; Fax : 33 5 56 83 51 04

E-mail : r.de-wit@epoc.u-bordeaux.fr

Running title :

Key words : Bacteriochlorophyll *c*; Bacteriochlorophyll *e*, homologues, HPLC UV-Vis, LC-MS-MS, photo-adaptation

Abstract

Two green sulfur bacteria, i.e. *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 were grown in liquid cultures under green light (480 - 615 nm) under a range of light intensities (0.2, 0.8, 1.2, 3.5, 4.3, 6, 9.2, 40 and 55.7 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). These conditions reflect the light climate occurring in the water column at different depths. The pigment composition was determined by Liquid Chromatography coupled both to UV-Vis spectrometry (LC-UVvis) and to mass spectrometry (LC-MS).

The growth rates of *P. aestuarii* under green light achieved a maximum of 0.06 h^{-1} at light intensities exceeding 6 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which is lower than the maximum observed under white light (approximately 0.1 h^{-1}). Under green light, the maximal growth rates of *C. phaeobacteroides* were slightly higher (0.07 h^{-1}) than observed for *P. aestuarii* and were achieved at 3.5 and 4.3 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ green light. The BChl. *c* homologues of *P. aestuarii* were mainly farnesyl esterified forms (> 90 %). The different farnesyl esterified BChl. *c* homologues differed by mass with multiples of 14 daltons (-CH₂-) and their proportion varied as a function of the light intensity. The specific content of total BChl. *c* increased up to four fold with decreasing light. But while a maximum value of 488 $\mu\text{g BChl. c mg}^{-1}$ protein was observed at 3.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at still lower intensities both the specific contents and the specific growth rates dropped off. For, *C. phaeobacteroides*, the specific contents of BChl. *e* were maximal at 4.3 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (91.4 $\mu\text{g BChl. e mg}^{-1}$ protein), but this species was characterised by high carotenoid (isorenieratene) contents. The major BChl. *e* forms were esterified with a whole range of isoprenoid and straight chain alcohols. The isoprenoid alcohols mainly comprised farnesol and to a lesser extent geranylgeranol. The straight chain alcohols included C₁₅, C_{15:1}, C₁₆, C_{16:1}, and C₁₇. Interestingly, the proportion of straight alkyl chain and isoprenoid esterified side chains shifted spectacularly with light intensity. Thus, the isoprenoid side chains dominated at low light intensities, while the straight chain alkyl substituents dominated at higher light intensities. This phenomenon may be explained as a result of changing availability of reducing power, i.e. the highly reduced straight chain alcohols have a higher biosynthetic demand for NADPH₂ than the poly-insaturated isoprenoid of the same number of C atoms.

Résumé

Des cultures liquides de deux souches de bactéries sulfureuses vertes *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 et *Chlorobium phaeobacteroides* UdG 6030 ont été réalisées en lumière verte, (480-615 nm) à différentes intensités lumineuses (0.2, 0.8, 1.2, 3.5, 4.3, 6, 9.2, 40 et 55.7 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ces conditions lumineuses simulent les régimes lumineux présents à différentes profondeurs de la colonne d'eau. La composition pigmentaire a été déterminée par Chromatographie Liquide UV-Vis (CLHP-UV-Vis) et Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie (CL-SM).

Les taux de croissance de *P. aestuarii* cultivé en lumière verte étaient maximum, 0.06 h^{-1} à des intensités supérieures à 6 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ce qui est plus faible que le taux de croissance maximum observé lorsque la souche était cultivée en lumière blanche (0.1 h^{-1}). En lumière verte, les taux de croissance maximum de *C. phaeobacteroides* étaient atteints à 3.5 et 4.3 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et sensiblement supérieurs (0.07 h^{-1}) à ceux observés pour *P. aestuarii*. Chez *P. aestuarii*, les homologues de BChl. *c* étaient majoritairement constitués de formes estérifiées avec le farnesyl (>90%). Ces différents homologues se différenciaient les uns des autres par une différence de masse de 14 daltons ($-\text{CH}_2$) et leur proportion variait en fonction de l'intensité lumineuse. La teneur spécifique en BChl. *c* augmentait avec l'intensité lumineuse et atteignait des valeurs quatre fois supérieures aux plus fortes intensités. Tandis qu'une valeur maximale de 488 $\mu\text{g BChl. c mg}^{-1}$ protéines était atteinte à 3.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les teneurs spécifiques et les taux de croissance étaient très fiables aux intensités les plus basses. Pour *C. phaeobacteroides*, les teneurs spécifiques en BChl. *e* étaient maximales (91.4 $\mu\text{g BChl. e mg}^{-1}$ protéines) pour une intensité de 4.3 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mais cette espèce était caractérisée par une forte teneur en caroténoïdes (isoréniératène). Les formes majeures de BChl. *e* étaient estérifiées avec une grande diversité d'alcools isoprénoides et à chaîne linéaire. Cette dernière catégorie comprenait des formes C_{15} , $\text{C}_{15:1}$, C_{16} , $\text{C}_{16:1}$, et C_{17} . La proportion de ces différentes formes variait de façon considérablement avec l'intensité lumineuse. Ainsi, alors que la proportion d'alcools isoprénoides était supérieure aux faibles intensités lumineuses, la proportion d'alcools à chaîne linéaire augmentait aux plus fortes intensités. Ce phénomène peut être expliqué par les contraintes dues à la demande en pouvoir réducteur NADPH_2 , qui sont plus élevées à basse intensité et donc propices à la synthèse de formes isoprénoides.

Introduction

Green sulfur bacteria are phototrophic and strictly anaerobic micro-organisms that proliferate in anoxic layers of aquatic ecosystems where reduced sulfur compounds are exposed to light (van Gemerden & Mas, 1995). They contain bacteriochlorophyll *c* and/or *d* or *e* as major light-harvesting pigment, which exist as many allomeric forms referred to as homologues. These homologues differ by the esterifying alcohol present at position C-17 and the alkylated substituents at positions C-8 and C-12 on the macrocycle (Senge & Smith, 1995). In 1978, bacteriochlorophylls homologues from cultures of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* were firstly identified in detail and farnesol was found as the major esterifying alcohol (Caple *et al.*, 1978). Thereafter, the use of HPLC coupled to UV-Vis (diode array) detection indicated that a larger number of homologues is present in several Chlorobiaceae species (Borrego and Garcia-Gil, 1994). They observed minor proportions of the so-called “secondary” homologues with longer retention times, which reflected a more lipophilic character, suggesting that other alcohols than farnesol were esterified at position C-17. These observations led those workers to focus their studies on the pigment composition of green sulfur bacteria both in natural habitats and cultures experiments. First experiments carried out in natural populations of Chlorobiaceae clearly pointed out the effects of light quality on the pigment composition of these micro-organisms in the lakes (Borrego *et al.*, 1993; Borrego *et al.*, 1997). Concomitantly, culture experiments of several strains of Chlorobiaceae have reported about the modification of the pigment composition and distribution as a response to the prevailing light conditions (Borrego *et al.*, 1995; Borrego *et al.*, 1999(a), Guyoneaud *et al.*, 2001). The homologues have *in vitro* very similar absorption spectra and, unfortunately, the technique used did therefore not allow for the detailed molecular identification of these pigments. Recently, Airs *et al.* (2001) developed a new method combining LC-UV Vis and LC-MS-MS and applied it to analyse and identify the bacteriochlorophyll homologues of *Chlorobium phaeobacteroides* grown at a low light intensity (Airs *et al.*, in press).

The aim of the present study was the molecular identification of the pigments from two green sulphur bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium phaeobacteroides* and to study their response to a range of light intensities found in deep aquatic ecosystems. In order to simulate such light conditions occurring at different depths in the water column, both strains were grown under green light under a range of intensities. The pigments from these

cultures have been described and quantified by combining LC-UV Vis and LC-MS-MS following the method described by Airs *et al* (in press).

Methods

Bacterial strains

Two strains of strictly anaerobic and anoxygenic green sulphur bacteria, *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 were grown in liquid batch cultures under different green light intensities. *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 belongs to the culture collection of the Laboratory of Biological Oceanography (University of Bordeaux 1, Arcachon, France). *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 belongs to the culture collection of the department of Aquatic Ecology of the University of Girona (Spain).

P. aestuarii strain CE 2404 is a spherical and nonmotile bacterium with extrusions containing different forms of bacteriochlorophyll *c* (BChl *c*), i.e. homologues and carotenoids from the chlorobactene series as the major pigments. *C. phaeobacteroides* strain UdG 6030 is a brown rod green sulphur bacterium which major pigments comprise different forms of Bacteriochlorophyll *e* (BChl *e*), i.e. homologues and carotenoids from the isorenieratene series. Both strains also contain Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) located in the reaction centre, associated with the baseplate of the chlorosome and as a component of the soluble FMO protein.

Both *P. aestuarii* strain CE 2404 and *C. phaeobacteroides* strain UdG 6030 grow only photolithotrophically with sulphide and elemental sulphur as major electron donor. Thiosulphate is not used as electron donor and sulphite is even inhibitory for growth in the case of *P. aestuarii*.

Culture conditions

Both species were grown in a synthetic medium (Biebl & Pfennig, 1978; Eichler & Pfennig, 1988) in completely filled 125 mL screw-capped flat bottles. The medium contained for 1 liter: 950 mL distilled water, 0.35 g KH_2PO_4 , 0.5 g NH_4Cl , 0.05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mL H_2SO_4 2M and 1 mL SL-12B solution (Eichler & Pfennig, 1986). The

medium was amended with 20 g NaCl, 0.5 g MgSO₄.7H₂O and 0.4 g MgSO₄.7H₂O, in the case of *P. aestuarii* and *C. phaeobacteroides*, respectively. After sterilisation, NaHCO₃ and Na₂S were added from concentrated autoclaved solutions (Guyoneaud, 1996). 1 mL of vitamin solution V7 (Pfennig & Trüper, 1992) was also added to the medium. 12 mL of active bacterial cultures were inoculated in ten different bottles that were placed on balancing shaker (Bioblock Scientific, France) to allow the permanent mixing of the cultures.

The cultures were illuminated from above by a 400W fluorescent light beam (SON-T Agro, Phillips), using a 16 hours / 8 hours light / dark regime. Different light intensities were achieved by placing the culture bottles at the adequate distance from the light source and by placing a neutral density gelatin filter (Kodak Wratten, Tiffen USA) at the surface of each bottle. A green gelatin filter (CAT 149 7395 n° 58, Kodak Wratten, Tiffen, USA) was placed in the light-path to filter out the blue, red and infrared wavelengths. As a result, the light spectrum reaching the surface of the bottles was comprised between 480 and 615 nm (see Fig. II. 2 Chapter 2). The incident light was measured at the surface of each bottle using an optic sensor OL 4000 Q (DELTA Lys & Optik, Lyngby, Danemark) coupled to an amplifier (1000 mV/ 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$). The range of tested intensities comprised 0.2, 0.8, 1.2, 3.5, 4.3, 6, 9.2, 40 and 55.7 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. The results obtained for *C. phaeobacteroides* grown at 1.2 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ will not be discussed in the further study.

Growth measurements

The bacterial growth was daily monitored by measuring of the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) directly in the 1.5 cm-thick flat bottles, using a Uniskan II photometer normally used for reading microtiterplates (Labsystems, France).

Pigment and protein analysis

After the incubation time, 10 ml and 50 ml of each culture were centrifuged 3 times (Heraeus, Seli, France) at 3000 x g for 20 minutes for pigment and protein analysis, respectively. The cell pellets were stored at -80°C until use.

Protein concentration was measured from the pigment-free pellets according to Lowry *et al.* (1951) by a lecture of the optical density at 663 nm (OD₆₆₃, Safas, Monaco, France).

For the pigment analysis, thawed samples were extracted by sonication in acetone (100%, 4°C). Following centrifugation (5 min at 3000 x g, Jouan), the supernatant was filtered

through a solvent extracted cotton wool plug. The extraction procedure was repeated twice and the extracts were combined and reduced to a minimum volume *in vacuo*. Samples were protected from the light and stored in a freezer at 4°C after extraction.

High performance Liquid Chromatography (LC UV-Vis) and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS-MS)

The LC and LC-MS procedures used in the present study have been previously described in detail by Airs *et al* (2001) and are summarised below.

Reversed-phase LC was accomplished using a Waters (Milford, MA USA) system comprising a 717 autosampler, 600 MS system controller, and 996-photodiode array detector. Instrument control, data processing, and analysis were performed using Water Millennium 2010 software. All solvents were degassed using helium. LC-MS was performed as described previously (Airs *et al.* 2000) and with UV-Vis detection at 473 nm. Following the chromatographic separation as chlorophylls, these compounds were demetallated in line prior to injection into the MS where they were fractionated as their corresponding phaeopigments.

Preparation, isolation and hydrolysis of phaeophytins

To demetallate the chlorophylls, an extract of *P. aestuarii* and *C. phaeobacteroides* in diethyl ether was shaken with hydrochloric acid in a separating funnel. The acid layer was discarded, the ether layer washed thoroughly with distilled water and the extract reduced to a dryness *in vacuo* (see Airs *et al*, 2001 for details).

The demetallated pigment extract in acetone was purified by chromatography on sucrose using hexane as mobile phase under a pressure of N₂. The purified phaeophytins fraction was subjected to trans-esterification to the phaeophorbide methyl esters by reflux in a 50 mL 1M KOH/MeOH for 1 hour. After cooling, the reaction mixture was combined with HCl and dichloromethane (DCM) in a separating funnel. The organic layer was separated and washed thoroughly with distilled water and reduced to a minimum volume *in vacuo* prior to chromatography on thin layer chromatography grade silica in a pasteur pipette. The sample was added in DCM and the alcohol fraction, eluted with 50:50 DCM:MeOH, was reduced to a minimum volume *in vacuo*.

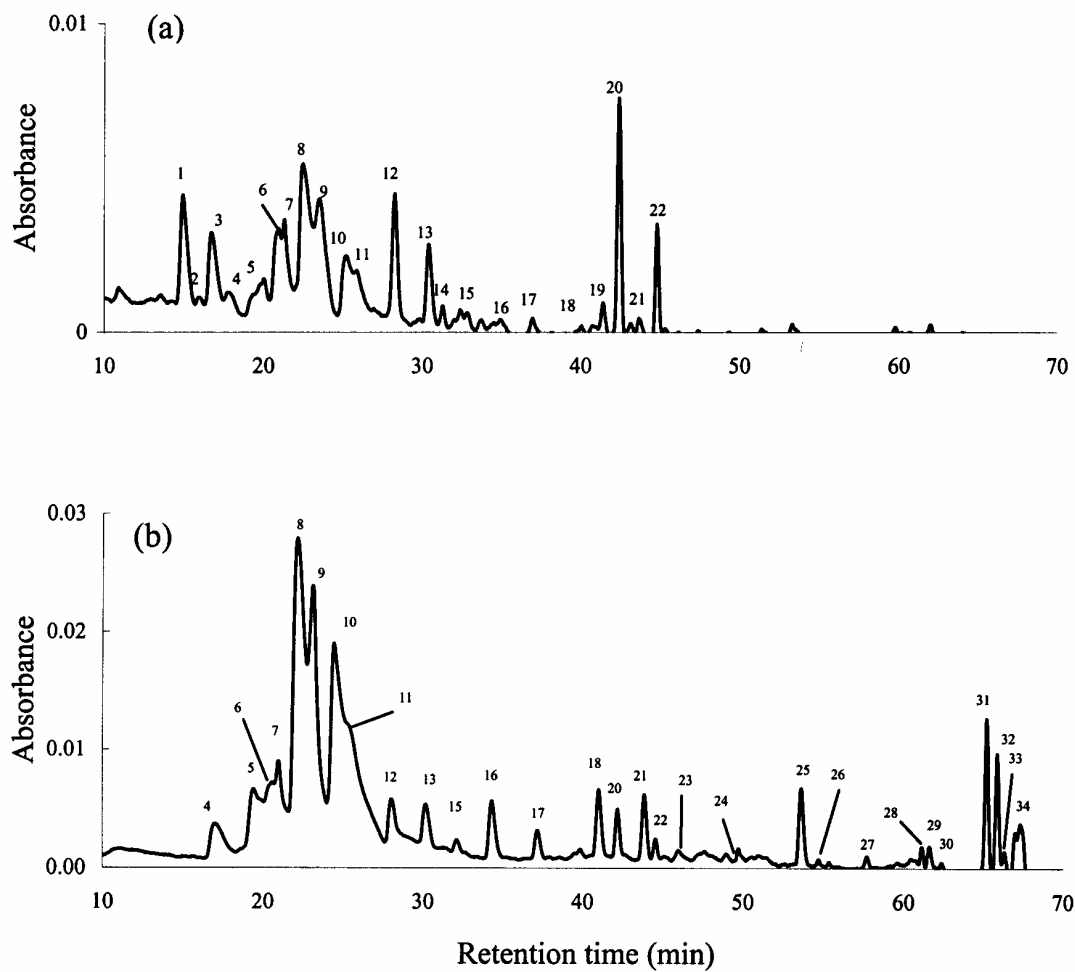


Figure IV. 1: HPLC UV-Vis chromatogram (300-800 nm) of pigment extracts from *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404, grown at (a) 9.2 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and (b) 1.2 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The detection was operated at 440 nm. For peak assignment see table 1. Note difference of absorbance scale.

Pigment quantification

Since authentic standards were not available, pigment contents were quantified from peak area assuming an extinction coefficient of $86 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 440 nm for BChl *c* (Stal *et al.* 1984), $84.1 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 770 nm for BChl *a* (Fenchel, 1998), $49.1 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 654 nm for BChl *e* (Borrego *et al.* 1999b), $304 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 440 nm for chlorobactene (Foppen, 1971), and $236 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 440 nm for isorenieratene (Foppen, 1971).

Results

Both strains of green sulphur bacteria *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grew under the different intensities of visible green tested. The specific growth rates of both bacteria varied as a function of the light intensity tested. The growth rate calculated for *P. aestuarii* was low, i.e. $< 0.01 \text{ h}^{-1}$ to 0.05 h^{-1} for the lowest intensities tested between 0.2 to $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. It increased with the increasing intensities, reaching a maximum value of 0.06 h^{-1} at $6 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and then decreased to 0.04 h^{-1} for the highest intensities. The specific growth rate calculated for *C. phaeobacteroides* strain UdG 6030 increased with the light intensity until reaching a maximum value of 0.07 h^{-1} both at 3.5 and $4.3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The growth rate then decreased concomitantly with the increasing intensities until reaching a minimum value of 0.02 h^{-1} at the highest intensity tested, i.e. $55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Prosthecochloris aestuarii strain CE 2404

LC-UV Vis and LC-MS allowed to resolve the pigment composition of the extracts of *P. aestuarii* for all the intensities tested. No pigment was found in the cultures grown at the highest intensities, i.e. 40 and $55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The analyses showed that the pigment distribution was mainly composed of farnesyl esterified forms of bacteriochlorophyll *c*, chlorobactene and other carotenoids (Figure IV. 1 and Table IV. 1). The chromatograms depicted a group of 6 major bacteriochlorophyll *c* homologues esterified with farnesol which were eluted between 20 and 25 minutes (peak 6 to 11). These pigments were identified by their mass spectra and corresponded to 3 different alkylated states of the BChl. *c* molecule, at positions C-8 and C-12 (see Table IV. 1). They comprise a bacteriochlorophyll *c* chlorine of i) 34 C atoms with ethyl and methyl group at positions C-8 and C-12, respectively (Peaks 6 and 7 called P34), ii) 35 C atoms with ethyl and ethyl or propyl and methyl at positions C-8 and

Table IV. 1: Assignment of pigments of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404.

Peak Number	Retention time (mn)	UV/Vis absorption bands (nm)	(M+H) ⁺ (m/z)	(M+H-alkyl) ⁺ (m/z)	Mass of alkyl fragment (daltons)	Pigment	Assignment
1	14.91	(392)460/680	799	595		BChl type	Farnesyl
2	15.98	(389)460/678	813	809		BChl type	Farnesyl
3	16.8	(391)460/676	813			n.d.	
4	17.8	(362)437/768	827	623	204	n.d.	Farnesyl
5	19.5	415/660	757	553	204	n.d.	Farnesyl
6	20.6	432/662	771	567	204	BChl. <i>c</i>	Farnesyl
7	20.9	432/662	771	567	204	BChl. <i>c</i>	Farnesyl
8	22.1	433/666	785	581	204	BChl. <i>c</i>	Farnesyl
9	23.1	433/666	785	581	204	BChl. <i>c</i>	Farnesyl
10	24.4	433/666	799	595	204	BChl. <i>c</i>	Farnesyl
11	25.3	433/666	799	595	204	BChl. <i>c</i>	Farnesyl
12	28	360/560	817	613	204	n.d.	Farnesyl
13	30.2	360/551	831	627	204	n.d.	Farnesyl
14	31.3	412/669	801	597	204	n.d.	Farnesyl
15	32.2	360/660	845	641	204	n.d.	Farnesyl
16	34.3	409/667	n.d.	n.d.	n.d.	Coelution	
17	37	409/664	n.d.	n.d.	n.d.	Coelution	
18	40.9	404/666	771	567	204	Bphaeo <i>c</i>	Farnesyl
19	41.4	389/428/678	799	595	204	Bphaeo	Farnesyl
20	42.2	410/667	785	581	204	Bphaeo <i>c</i>	Farnesyl
21	43.8	414/670	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	44.8	412/666	799	595	204	Bphaeo <i>c</i>	Farnesyl
23	45.3	409/666	799	595	204	Bphaeo <i>c</i>	Farnesyl
24	49.7	448/475	647			Coelution	
25	53.6	447/476	760			n.d.	
26	55.3	440/469	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
27	55.7	(405)429/476	663			unid.car.	
28	61.2	449/476	563			unid.car.	
29	61.6	447/475	551			unid.car.	
30	62.3	452/482	581			unid.car.	
31	65.2	447/475	533			Cbt	
32	65.8	449/477	533			Cbt	
33	66.3	462/492	533			Cbt	
34	67.3	462/492	579			Cbt cis	

BChl.: bacteriochlorophyll; Bphaeo.: bacteriopheophytin; Cbt.: chlorobactene; n.d.: not determined; unid. car.: unidentified carotenoid

C-12, respectively (peaks 8 and 9 called P35) and iii) 36 C atoms with propyl and ethyl or buthyl and methyl at positions C-8 and C-12, respectively (peaks 10 and 11 called P36). In the chromatogram, this group was sandwiched between a prior group of bacteriochlorophyll-like pigment eluted between 14 to 19 minutes (peaks 1 to 5), and a cluster of other pigments eluted until 50 minutes, comprising coelution of BChl. *c* and *d* (peaks 16, 17 and 24), bacteriopheophytins esterified with farnesyl (peaks 18, 19, 20, 22, 23) and undetermined pigments (peaks 12 to 15 and 21). The latter part of the chromatograms comprised carotenoids mainly carotene (peak 25) and chlorobactene (peaks 31 to 34), but also unidentified carotenoids (peaks 26 to 30).

The relative bacteriochlorophyll *c* composition is depicted in Figure IV. 2. The specific BChl. *c* content increased gradually from 102 μg BChl. *c* / mg proteins when cultures were grown at the lowest intensity ($0.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) until reaching a maximum concentration of 488.5 μg BChl. *c* / mg proteins for cultures incubated at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The concentration of BChl. *c* then decreased for cultures incubated at higher intensities and reached the lowest value which was already found in cultures grown at the lowest, i.e. 108.3 μg BChl. *c* / mg proteins when cultures were grown at the intensity of $9.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figure IV. 3 depicts the relative proportion of P34, P35 and P36 pigments as a function of the light intensity used for the culturing. We observed a general trend for P34 to increase in proportion with increasing intensity, i.e., from 10 % when cultures were grown at the lowest light intensity ($0.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), to approximately 30 % when *P. aestuarii* was cultured at $9.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. In contrast, the proportion of P36 ranged between ca. 40 % and 20 % when cultures were grown at $1.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and $9.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with a general trend to decrease with increasing light intensity. In contrast, the relative proportion of P35 remained rather constant at the level of about 55 % of the total farnesyl esterified BChl. *c* homologues for the whole range of the intensities tested.

Finally, the LC procedure resolved a latter group of carotenoids, i.e. carotene and chlorobactene, eluting between 63 and 70 minutes. Except for the experiment carried out at $9.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, carotenoids were detected in each sample analysed. In major cases, chlorobactene was the major carotenoid pigment representing approximately 70 % of the total carotenoids pigment. But, it reached 100 % when *P. aestuarii* was grown at the lowest light intensity ($0.8 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, data not shown). In contrast, carotene was the major pigment in only one experiment, when *P. aestuarii* was grown at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ samples, reaching a proportion of 60 % of the total carotenoids. The molar ratio

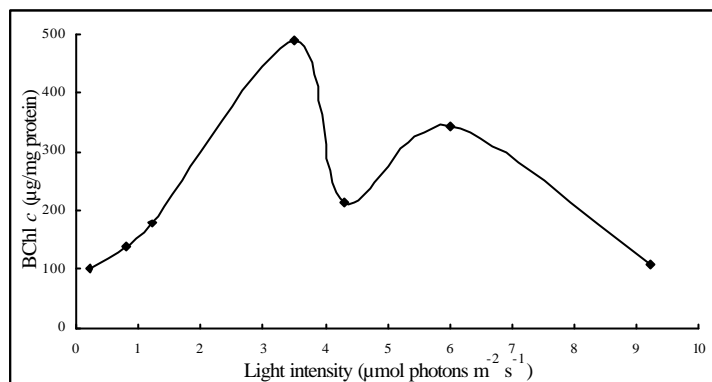


Figure IV. 2: Total Bacteriochlorophyll *c* specific content of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 grown at the different light intensities tested.

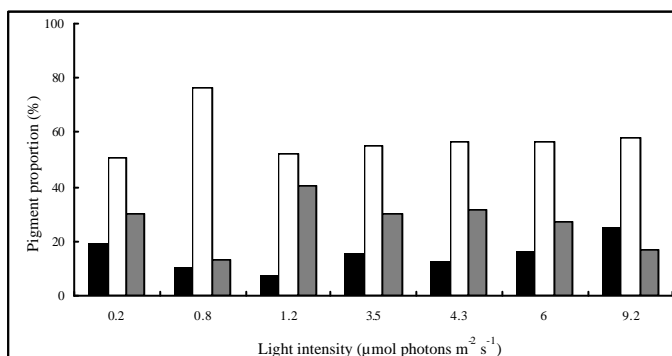


Figure IV. 3: Proportion of the different farnesyl esterified forms of Bacteriochlorophyll *c* of *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 grown at the different light intensities tested. The different color correspond to the substituent group at positions C-8 and C-12. In black : C-8 = Ethyl, C-12= Methyl; in white : C-8 = Ethyl and C-12 = Ethyl or C-8 = Propyl and C-12 = Methyl; in gray w: C-8 = Propyl and C-12 = Ethyl or C-8 = Butyl and C-12 = Methyl.

between BChl. *c* and total carotenoids content (Cbt+Car) showed a maximum value of 50 % when cultures were grown at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ and was constant at ca. 30 % when *P. aestuarii* was cultured at the other light intensities (data not shown).

Chlorobium phaeobacteroides strain UdG 6030

Figure IV. 4 depicts the LC chromatograms of the pigment extracts from *C. phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pigment identification is reported in Table IV. 2. Qualitatively, the pigment distribution exhibit the same profiles for the all different light intensities tested. The chromatogram depicts a main group of 6 major bacteriochlorophyll *e* homologues esterified with farnesol, which eluted between 17 and 22 minutes (peak 3 to 8). These pigments were identified by their mass spectra and corresponded to 3 different alkylated states of the BChl.*e* chlorine, with i) ethyl and ethyl (peaks 3 and 4), ii) propyl and ethyl (peak 5 and 6) and butyl and ethyl (peaks 7 and 8) at positions C-8 and C-12, respectively (see Table IV. 2). In the chromatogram, this group was sandwiched between a first group of two bacteriochlorophyll *e*-type pigments (peaks 1 and 2) and a second group of pigments comprising bacteriochlorophyll *e* forms esterified with other alcohols than farnesyl (peaks 9 to 19 eluted between 25 and 35.5 minutes) and unidentified pigments (peaks 20 to 24). Bacteriochlorophyll *e* pigments comprised bacteriochlorophyll *e* esterified with geranylgeranol (peak 10) and different linear alcohols with straight chain of 15 (peaks 9, 15), 16 (peaks 11 to 14, 16 and 19), and 17 C atoms (peak 17), respectively. The latter part of the chromatogram eluted between 60 and 75 minutes, was composed of unidentified carotenoids (peaks 26, 27 and 29 to 35) and isorenieratene (peaks 25 and 28).

The BChl *e* content is depicted in Figure IV. 5 as a function of the light intensity used for the culturing of *P. aestuarii*. It appears that the concentration of BChl. *e* increased linearly when the intensity increased from $0.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ to $4.3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, reaching a maximum concentration of $91.4 \mu\text{g BChl. } e / \text{mg proteins}$ when cultures were grown at the latter intensity. The BChl. *e* concentration then decreased gradually to $70 \mu\text{g BChl. } e / \text{mg proteins}$, which remained constant when *C. phaeobacteroides* was cultured at the highest light intensities, i.e. $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ and $55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. The molar ratio of isorenieratene to BChl. *e* did not vary and was constant at the value of 1 for all the intensities tested (data not shown).

The proportion of linear alcoholic esterified BChl. *e* homologues increased when the light intensity increased, ranging from 20 % of the total BChl. *e* content when cultures were grown at low light intensity, i.e. $0.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ to ca. 80 % when *P. aestuarii* was

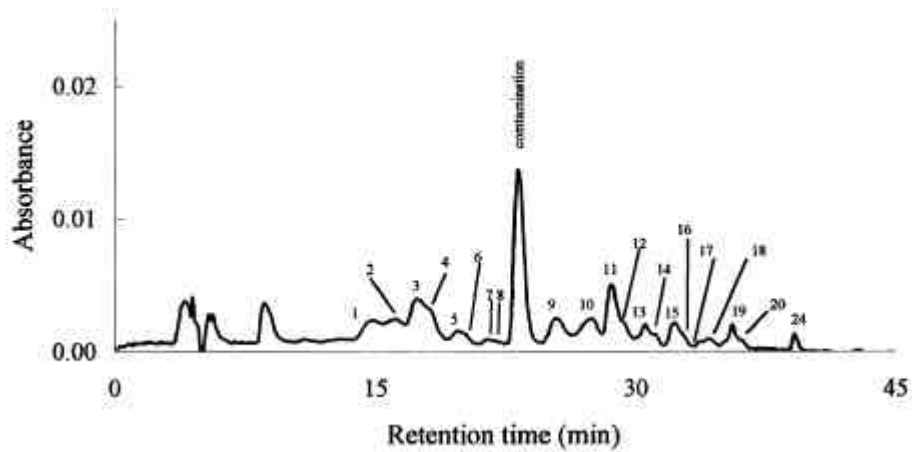


Figure IV. 4: HPLC UV-Vis chromatogram (300-800 nm) of pigments extracts from *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Detection was operated at 440 nm. For peak assignment see table 2.

cultured at the highest light intensity, i.e. $55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ (Figure IV. 6a). In contrast, the proportion of BChl. *e* homologues esterified with isoprenoid alcohols such as farnesyl and geranylgeranol decreased when the light intensity increased. Thus, the farnesyl and geranylgeranol esterified BChl. *e* proportion varied from 80 % to ca. 20 % when cultures were grown at 0.2 and $55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, respectively (Figure IV. 6b). Moreover, farnesyl was predominant among the isoprenoid substituents, except for cultures were grown at $9.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ and at $55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. In the latter case, geranylgeranol was the only isoprenoid substituent.

Discussion

Chlorobium phaeobacteroides and *Prosthecochloris aestuarii* are two strictly anaerobic strains of green sulphur bacteria that are commonly found in the anoxic zone of aquatic ecosystems. Whereas *C. phaeobacteroides* is strictly pelagic and is commonly found in the water column of deeper lakes, *P. aestuarii* is able to develop both as a pelagic form in shallow environments or as a benthic one in the anoxic layers of the sediment. Many studies have reported about the effect of light intensities on the pigment composition and the homologues distribution in Chlorobiaceae species (Vila & Abella, 1994; Borrego *et al.*, 1995; Borrego *et al.*, 1999a; Guyoneaud *et al.*, 2001). However, until recently, only one study has succeeded in analyzing and identifying the different homologues of BChl. *e* in *Chlorobium phaeobacteroides* cultured at a very low light intensity, i.e. $1 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Airs *et al.*, in press). In the present work, we simulated light conditions that exist both in the deeper layers of the water column and in the sediments of very deep environments, by cultivating both strains of Chlorobiaceae under different green light intensities. To our knowledge, this paper reports for the first time about the identification of the pigment content of *P. aestuarii* and *C. phaeobacteroides* cultivated under such light conditions.

The response of both strains to the different green light intensities depended on the species studied. As shown in Figure IV. 1 and Table IV. 1, we only found farnesyl as esterifying alcohol of bacteriochlorophyll *c* in extracts of *P. aestuarii* for all the green light intensities tested. These observations are in agreement with previous studies stating that most of the BChl. *c* of green sulphur bacteria are esterified with farnesol (Caple *et al.*, 1978). In 1994, Borrego and Garcia-Gil suggested the occurrence of secondary homologues of BChl. *c* comprising allomers that are esterified with other alcohols. In our case, we only found

Table IV. 2: Assignment of pigments of *Chorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030.

Peak Number	Retention Time (mn)	UV/Vis absorption bands (nm)	(M+H) ⁺ (m/z)	(M+H-alkyl) ⁺ (m/z)	Mass of alkyl fragment (daltons)	Pigment	Assignment
1	14.6	457/665	813	609	204	BChl. <i>e</i> type	Farnesyl
2	15.5	457/659	799	595	204	BChl. <i>e</i> type	Farnesyl
3	17.6	473/656	799	595	204	BChl. <i>e</i>	Farnesyl
4	17.9	467/659	799	595	204	BChl. <i>e</i>	Farnesyl
5	19.9	476/666	813	609	204	BChl. <i>e</i>	Farnesyl
6	20.1	476/666	813	609	204	BChl. <i>e</i>	Farnesyl
7	21.4	471/660	827	623	204	BChl. <i>e</i>	Farnesyl
8	21.7	472/659	827	623	204	BChl. <i>e</i>	Farnesyl
9	25.3	460/652	803	595	208	BChl. <i>e</i> type	C15:1
10	27.3	465/652	867	595	272	BChl. <i>e</i> type	Geranylgeranol
11	28.5	471/653	817	595	222	BChl. <i>e</i>	C16:1
12	29.2	471/653	817	595	222	BChl. <i>e</i>	C16:1
13	30.5	471/653	831	609	222	BChl. <i>e</i>	C16:1
14	31.1	471/653	831	609	222	BChl. <i>e</i>	C16:1
15	32.2	466/650	805	595	210	BChl. <i>e</i> type	C15
16	32.8	466/650	845	623	222	BChl. <i>e</i>	C16:1
17	33.7	458/647	831	595	236	BChl. <i>e</i> type	C17:1
18	34.1	465/669	n.d.	n.d.	n.d.		
19	35.5	472/653	819	595	224	BChl. <i>e</i>	C16
20	36.2	463/651/696	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	36.9	471/659	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	37.7	472/659	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23	38.3	471/659	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24	39.1	472/660	873	595	278	n.d.	Phytyl
25	62.1	453/480	529			Isr	
26	63	451				unid. car	
27	63.5	441/469				unid. car	
28	63.9	447/475				cis B isr	
29	65.3	441/469				unid. car	
30	67.7	454/478				unid. car	
31	68.5	446/476				unid. car	
32	69.5	446/473				unid. car	
33	73.2	453				unid. car	
34	73.9	448/476				unid. car	
35	74.8	449				unid. car	

BChl.: bacteriochlorophyll; isr.: isorenieratene; n.d.: not determined; unid.car.: unidentified carotenoid

farnesyl as the esterifying alcohols in all cases (m/z 204, see Table IV. 1) and the secondary homologues were not detected. In contrast, many bacteriopheophytins esterified with farnesyl were detected after 40 minutes (see Table IV. 1). We can thus suppose that the presence of these phaeophytins, which occurred in rather large quantities, have masked the secondary homologues of BChl. *c* that could therefore not be detected. We clearly observed that the proportion of the different alkylated forms of BChl. *c* esterified with farnesyl was light dependent. Our observations are in agreement with previous findings (Borrego *et al.* 1999a) suggesting that highly alkylated form, now identified as a P36 with Prop+Et or Bu+Me substituents, proportionally increased at low light intensity. In contrast, the less alkylated form, now identified as the Et+Me substituted form, increased with increasing light intensity. The form P35 substituted with Et+Et or Prop+Me, remained constant at the level of 35 %. The specific content of BChl. *c* of *P. aestuarii* reached higher values of ca. 500 $\mu\text{g BChl. } c \text{ mg}^{-1}$ protein when the bacterium was cultivated under the intermediate green light intensity of 3.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. These observations are close albeit higher than previously observed by Guyoneaud *et al.* (2001), when the same strain was cultivated at a light intensity of 5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ white light, and exhibited a BChl. *c* content of ca. 340 $\mu\text{g BChl. } c \text{ mg}^{-1}$ protein. Under this light quality, the strain also achieved a higher specific growth rate of about 0.1 h^{-1} , which was attained at 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$.

Under green light, the cultures of *C. phaeobacteroides* showed a slightly higher specific growth rate than *P. aestuarii*, i.e. 0.07 h^{-1} , which was achieved at 4.3 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a lower saturating value than observed for *P. aestuarii*. This confirms that the brown-colored Chlorobiaceae are better adapted to low light than the green strains as reported previously in many studies (Airs *et al.* in press; Borrego *et al.* 1995, Borrego *et al.* 1997). The BChl. *e* allomers comprised a whole set of different esterified alkyl substituents at position C17 (see Fig. IV. 4 and Table IV. 2). This is in contrast with what was observed for *P. aestuarii* cultures, where farnesyl was the main esterifying alcohol found in all the cultures. For *C. phaeobacteroides*, the alkyl substituents comprised farnesyl and other forms of isoprenoids as well as straight-chain C₁₅, C_{15:1}, C₁₆, C_{16:1}, and C₁₇ alkyls. Such forms have been reported previously, but were always found in minor proportion compared to farnesyl (Caple *et al.* 1978; Borrego *et al.* 1998). The proportion of these different forms whether isoprenoid or straight-chain depended on the light intensity used for the culturing. Whereas the straight-chain forms increased proportionally with increasing light, with a very major proportion of the hexadecanoic forms for all the intensities tested, isoprenoid forms increased at the lower intensities and comprised major farnesyl. However, when *C.*

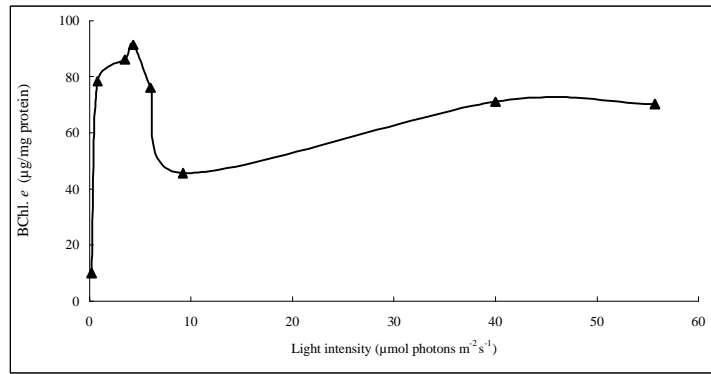


Figure IV. 5: Total Bacteriochlorophyll *e* specific content of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at the different light intensities tested.

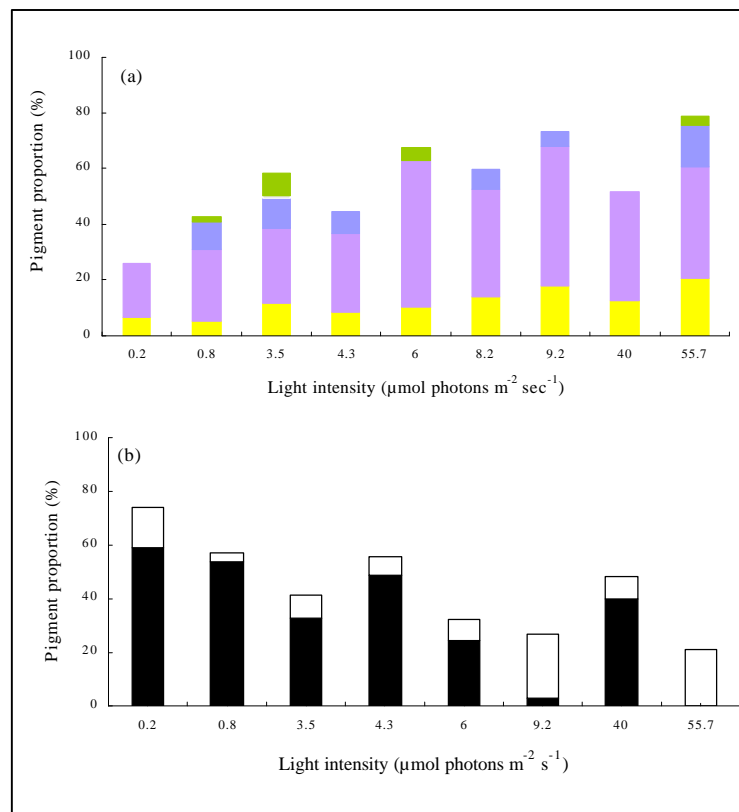
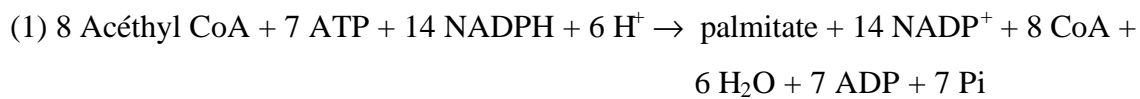


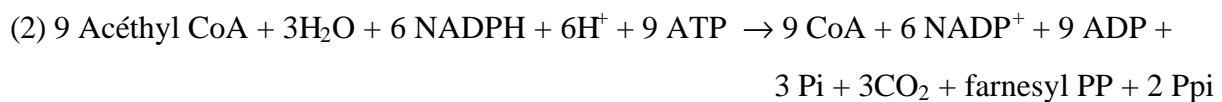
Figure IV. 6: Proportion of the different esterified forms of Bacteriochlorophyll *e* of pigment extracts from *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 grown at the different light intensities tested. (a): The proportion of linear alcoholic esterified homologues of BChl. *e*; ■ : C16:1; ■ : C15:1; ■ : C15; ■ : C16; ■ : C17. (b): The proportion of the cyclic esterified homologues of BChl. *e* ■ : esterifying alcohol = farnesol; ■ : esterifying alcohol = geranylgeranol.

phaeobacteroides was cultured at higher intensities, isoprenoid forms were strongly dominated by geranylgeranol thus suggesting that longer carbon isoprenoid chain could only be synthesised when green light intensity was increased.

We have seen that the response of both Chlorobiaceae strains to variations of the green light intensity is different. We can thus suppose this response as either an acclimation to optimize photosynthetic apparatus or a pragmatic solution to biosynthetic pathways? In order to test this hypothesis, we resumed the synthetic pathways of both fatty acids (1) and isoprenoid (2) esterifying forms bacteriochlorophyll by (Stryer, 1995):



Additional NADPH₂ is required to convert palmitate in the corresponding C₁₆ alcohol.



In terms of energy, the formation of fatty acids such as palmitate needs more than twice more NADPH₂ than the synthesis of an isoprenoid form such as farnesyl. Additional NADPH₂ is required to convert palmitate in the corresponding C₁₆ alcohol. Thus, synthesis of reduced straight-chain alcohols has a very high demand on reducing power. In green sulphur bacteria, it is generally assumed that NADP is reduced to NADPH₂ by reduced ferredoxin, which is thus coupled to linear electron transport in photosynthesis. However, recent studies have shown that *Chlorobium tepidum* does not contain the gene coding for the enzyme involved (Ferredoxin NADP⁺ reductase) (Bryant, pers com. TIGR project) and alternatively it has been proposed that NADPH₂ is obtained through uphill electron flow coupled to dissipation of pmf. Hence, at lower intensities, i.e. lower energy, less NADPH₂ is synthesised, thus favouring the formation of isoprenoid forms. In contrast, at higher light intensities, more energy is available for the synthesis of straight chain of C atoms, as described by Figure IV. 6. The different proportion of isoprenoid and linear esterifying alcohols of BChl. *e* in *C. phaeobacteroides* would thus be a function of the energy available for photosynthesis, better than a photo-acclimation.

Aknowledgements

We thank Dr. Jesus Garcia-Gil for supplying the culture of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030. Astrid Massé was supported by a fellowship from the Région Aquitaine (SW France).

References

- Airs, R.L., Atkinson, J.E. & Keely, B.J.K. (2001). Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *J. Chromatogr. A* **917**: 167-177.
- Airs, R.L., Borrego, C.M., Garcia-Gil, J. & Keely, B.J.K. Identification of the bacteriochlorophyll homologues of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6053 grown at light limitation. *Photosynthesis Research*. In press.
- Biebl, H. & Pfennig, N. (1978). Growth yields of green sulphur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **117**: 9-16.
- Borrego, C.M., Gerola P.D., Miller M; & Cox R.P. 1999 (a). Light intensity effects on pigment composition and organisation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Photynth. Res.* **59**: 159-166.
- Borrego, C.M., Arellano J.B., Abella C.A., Gillbro T & Garcia-Gil J. 1999 (b). The molar extinction coefficient of bacteriochlorophyll *e* and the pigment stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides*. *Photosynth. Res.* **60**: 257-264.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Vila X., Cristina X.P., Figueras J.B. & Abella C.M. 1997. Distribution of bacteriochlorophyll homologs in natural populations of brown-colored phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 301-309.

Borrego, C.M. & Garcia-Gil L.J. 1995. Rearrangement of light harvesting bacteriochlorophyll homologues as a response of green sulfur bacteria to low light intensities. *Photosynth. Res.* **45**: 21-30.

Borrego, C.M. & Garcia-Gil J. 1994. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth. Res.* **41**: 157-163.

Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Bañeras L. & Brunet R.C. 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of Lake Banyoles (Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 720-725.

Caple, M.B., Chow H. & Strouse C.E. 1978. Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria : The esterifying alcohols of bacteriochlorophylls *c* from *Chlorobium limicola*. *J. Biol. Chem.* **253**: 6730-6737.

Caumette, P. 1989. Ecology and General Physiology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria in Benthic Environments, p. 283-304. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), *Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society for Microbiology, Washington, D C.

Eichler, B. & Pfennig, N. (1988). A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter purpureus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **149**:395-400.

Eichler, B. & Pfennig, N. (1986). Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pedioformis* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**: 295-300.

Fenchel, T. (1998). Formation of laminated microbial mats in the absence of benthic fauna. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **14**: 235-240.

Foppen, F.H. (1971). Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* **14**: 133-188.

Guyoneaud, R., Borrego C.M., Martínez-Planells A., Buitenhuis E.T. & Garcia-Gil L.J. 2001. Light responses in the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestaurii*: changes in

prosthecae length, ultrastructure, and antenna pigment composition. *Arch. Microbiol.* **176**: 278-284.

Guyoneaud, R. (1996). Étude écologique, physiologique et systématique des communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques en milieu lagunaire méditerranéen et atlantique. Ph D Thesis, University of Bordeaux 1, France, 225p.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J, Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* **193**: 265-275.

Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1992). The family Chromatiaceae. In *The Prokaryotes*, pp. 3200-3221. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer. New-York: Springer-Verlag.

Senge, M.O. & Smith K.M. 1995. Biosynthesis and structures of bacteriochlorophylls, p. 137-151 *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.

Stal, L.J., van Gemerden, H. & Krumbein W.E. (1984). The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J. Microbiol. Meth.* **2**: 295-306.

Stryer, L. 1995. *Biochemistry*, fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York. 1064 p.

Van Gemerden, H. & Mas, J. 1995. Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria, p. 49-85. *In* R.E. Blankenship, M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds), *Advances in photosynthesis volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.

Vila, X. & Abella C.A. 1994. Effect of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynth. Res.* **41**: 53-65.

CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons démontré que les Chlorobiaceae pélagiques *Prosthecochloris aestuarii* et *Chlorobium phaeobacteroides*, cultivées en lumière verte (480-615 nm), c'est-à-dire sans rayons infrarouges (IR), sont capables de se développer sous différentes intensités lumineuses des valeurs les plus faibles ($0.2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) aux plus élevées ($55.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La réponse chromatique de chaque micro-organismes lui est spécifique. En effet, alors que *C. phaeobacteroides* montre un taux de croissance supérieur pour des intensités lumineuses inférieures à $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, *P. aestuarii* a un taux de croissance supérieur pour des intensités plus élevées. La composition pigmentaire de chaque micro-organisme a été déterminée pour chaque intensité testée. Chez *P. aestuarii*, elle est majoritairement constituée de formes de bactériochlorophylle *c* estérifiées avec des alcools isoprénoides dont le quasi-unique représentant principal reste le farnesyl. Cet alcool a aussi été retrouvé comme forme estérifiée de la bactériochlorophylle *e* dans les cultures de *C. phaeobacteroides*. Cependant et contrairement à ce qui a été observé précédemment (Borrego *et al.* 1998), d'autres formes d'alcools isoprénoides (geranylgeranol) ou à chaîne linéaire ont aussi été retrouvées en grande proportion dans nos cultures. De plus, nous avons pu montrer une évolution contradictoire de ces différentes formes de bactériochlorophylle *e* : alors que la proportion de formes estérifiées avec les alcools à chaîne linéaire augmente avec l'intensité lumineuse, la proportion de formes estérifiées avec le géranylgeranol ou le farnesol est plus importante aux faibles intensités. Ces variations de proportion ont été notamment attribuées aux différences de besoin énergétique nécessaire pour former les deux types de molécules alcooliques.

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

1. Synthèse générale des résultats

Les bactéries phototrophes anoxygéniques sulfo-oxydantes prolifèrent dans les écosystèmes aquatiques peu profonds ou émergés comme les écosystèmes lagunaires, où elles utilisent la lumière et le sulfure comme source d'énergie et donneur d'électrons respectifs pour la photosynthèse. Dans les environnements où la colonne d'eau est rarement supérieure à 1 mètre, les bactéries sulfureuses vertes et pourpres, respectivement Chlorobiaceae et Chromatiaceae, sont soumises à des conditions lumineuses optimales (qualité et intensité) pour leur croissance. Grâce à la mise au point de systèmes de culture en sédiment artificiel (Pringault *et al.* 1996) et l'utilisation de nouvelles techniques de mesure par microsondes, la croissance des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae a été récemment étudiée, dans les conditions les plus proches de celles du milieu naturel, respectant les contraintes de lumière et de gradients physico-chimiques (pH, sulfure, oxygène).

Cependant, les écosystèmes lagunaires ou côtiers peuvent être soumis à des variations de la profondeur de la colonne d'eau qui peut alors augmenter et atteindre 5 à 10 mètres sous l'effet des courants de marée, à la suite de fortes précipitations, ou, dans les cas extrêmes, suite à une déglaciation. Dans ce cas, la colonne d'eau absorbant les rayons infrarouges (IR), l'intensité lumineuse à la surface du sédiment est alors amoindrie et le spectre lumineux majoritairement constitué de longueurs d'ondes visibles. Ces conditions lumineuses deviennent alors inhabituelles voire critiques pour la croissance des bactéries phototrophes sulfureuses, pour lesquelles la lumière constitue la principale source d'énergie. Aussi, il nous a paru intéressant de tester l'effet de ces conditions lumineuses sur l'écologie et la physiologie des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae dans les systèmes aquatiques.

Les bactéries sulfureuses vertes sont les micro-organismes majoritairement présents dans les systèmes benthiques. Dans un premier temps, nous avons donc choisi d'étudier l'effet des conditions lumineuses critiques uniquement sur les Chlorobiaceae. La souche bactérienne utilisée était *Prosthecochloris aestuarii* dont la croissance avait déjà été étudiée dans des cultures en sédiment artificiel (Benthic Gradient Chamber), sous des conditions lumineuses optimales (Pringault *et al.* 1998). Après cinq semaines de culture sous un régime lumineux appauvri en rayons infrarouges (IR), nous avons mis en évidence la formation d'un biofilm de *P. aestuarii* dans le sédiment. De plus, des mesures de l'activité photosynthétique ont montré que ce micro-organisme était capable d'une part de réaliser ses processus photosynthétiques en conditions lumineuses critiques, et d'autre part, de réagir en modifiant ces processus lorsque les conditions lumineuses redevenaient optimales (visible + infrarouge).

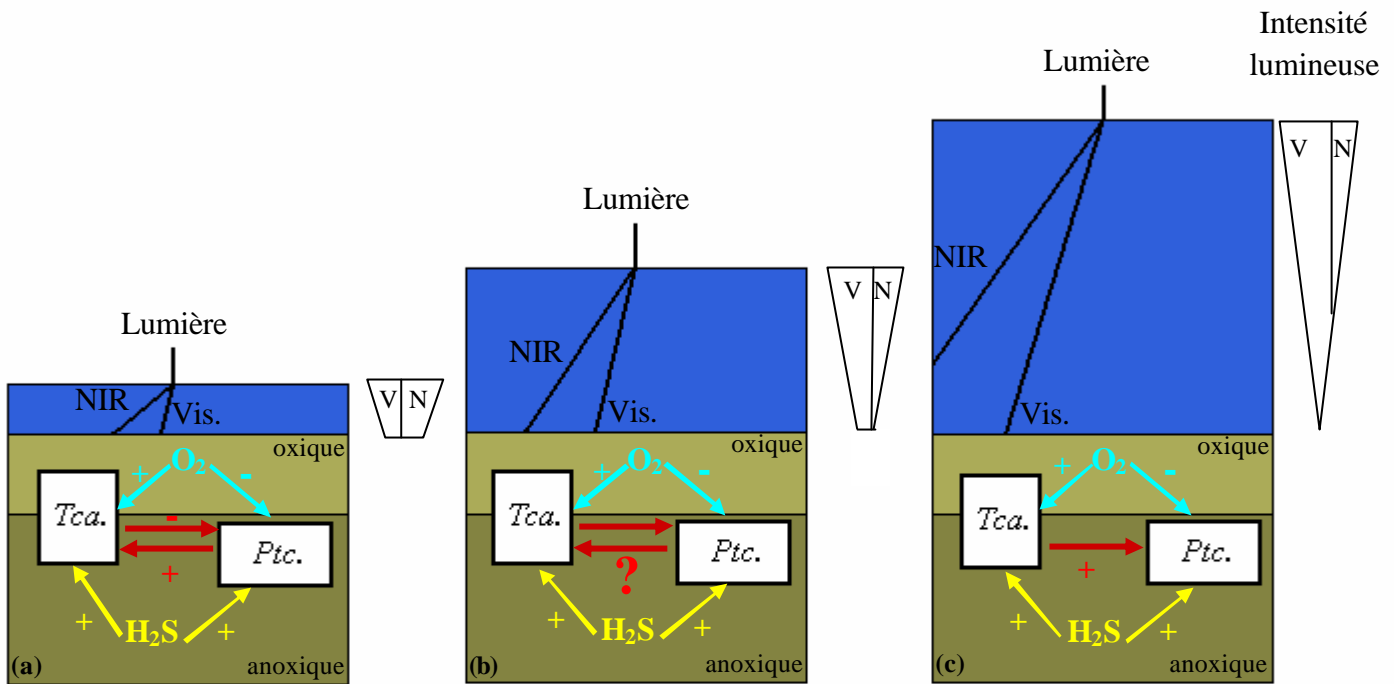


Figure V. 1: Schéma conceptuel de la croissance des bactéries phototrophes sulfureuses vertes, *Prosthecochloris aestuarii* CE 2404 (*Ptc.*) et pourpres, *Thiocapsa roseopersicina* 5811 (*Tca.*) dans les écosystèmes aquatiques: Rôle de la lumière et des paramètres physico-chimiques dans des sédiments exondés (a), submergés par une colonne d'eau de 0.5 à 1 mètre (b) et supérieure à 1 mètre (c). V: Vis (visible); N: NIR (proche infrarouge).

La première partie du chapitre III a donc clairement montré que les systèmes submergés représentent une niche écologique potentielle pour les bactéries sulfureuses vertes.

Dans les systèmes benthiques naturels, les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae se retrouvent au niveau de structures particulières que représentent les tapis microbiens, au sein desquels les deux communautés sont généralement distinctes et stratifiées (Pierson *et al.* 1987, 1990). Par ailleurs, ce schéma conceptuel de stratification a été récemment contesté (Pringault *et al.* 1999) par la mise en évidence de la coexistence à une même profondeur, de deux espèces de bactéries sulfureuses, *Prosthecochloris aestuarii* (Chlorobiaceae) et *Thiocapsa roseopersicina* (Chromatiaceae), cultivées en sédiment artificiel dans des conditions actuellement les plus proches possibles des conditions *in situ*. Dans ce cas, les deux souches bactériennes étaient en compétition pour le sulfure, donneur d'électron pour la photosynthèse. De même, une interaction croisée entre les deux souches avait été mise en évidence de telle sorte que la coexistence était bénéfique pour la bactérie pourpre et au contraire négative pour *P. aestuarii* (Fig. V. 1a). La seconde partie du chapitre III de ce travail avait donc pour objectif de déterminer l'impact de la qualité lumineuse, d'une part sur la distribution des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae, et d'autre part sur les interactions possibles entre ces communautés dans les sédiments submergés. Des cultures mixtes de *P. aestuarii* et *T. roseopersicina* ont été réalisées en sédiment artificiel, pendant cinq semaines d'incubation en lumière visible. Tout comme il avait déjà été observé dans les cultures en conditions lumineuses optimales, notre étude a mis en évidence la coexistence des deux souches bactériennes à une même profondeur, au sein d'un biofilm unique (Pringault *et al.* 1999). De plus, des mesures de profils de radiance de champs et de sulfure réalisées au sein du biofilm à l'aide de microsondes, ont montré que dans notre cas les deux souches bactériennes étaient en compétition pour la lumière. Enfin, notre étude a montré que *T. roseopersicina*, du fait de son métabolisme versatile, pouvait croître, dans les systèmes submergés, soit par chimio- soit par photolithotrophie. Dans le premier cas, la respiration de l'oxygène diminuait sa profondeur de pénétration dans le sédiment, permettant alors à *P. aestuarii*, espèce strictement anaérobie, de se développer plus proche de la surface et de profiter ainsi de meilleures conditions lumineuses. Contrairement à ce qui avait été observé par Pringault *et al.* (1999), la coexistence a été bénéfique pour la croissance de *P. aestuarii* alors qu'aucun effet véritable des conditions lumineuses utilisées pour la culture (visible), n'a été mis en évidence sur la croissance de *T. roseopersicina*. En d'autres termes, nous avons clairement démontré (chapitre III) que les bactéries sulfureuses vertes et pourpres peuvent se

développer, coexister et interagir dans des sédiments d'écosystèmes dont la colonne d'eau peut atteindre plusieurs mètres (Fig. V. 1c).

Certes, de telles conditions existent dans les milieux naturels. Cependant, la présence des bactéries sulfureuses vertes et pourpres y est tout de même assez exceptionnelle, car elle nécessite la combinaison de plusieurs paramètres tels que la présence d'une colonne d'eau peu turbide et d'un sédiment sableux présentant à la fois une faible profondeur de pénétration de l'oxygène et un fort taux de sulfato-réduction dans les couches les plus profondes. En revanche, les écosystèmes côtiers ou lagunaires de profondeurs intermédiaires à celles étudiées jusqu'ici, sont plus fréquemment caractérisés par une forte turbidité, principal facteur d'atténuation de la lumière. Dans ce cas, la coexistence des bactéries au sein du sédiment peut être possible. En revanche, il est difficile de prévoir les éventuelles interactions entre les communautés de Chlorobiaceae et de Chromatiaceae (Fig. V. 1b). Aussi, il serait intéressant d'appliquer nos méthodes de culture (Benthic Gradient Chamber) et d'analyses (microsondes et micro-électrodes) à l'étude de ces conditions intermédiaires. Finalement, le recueil des différentes données obtenues pour chaque cas étudié, pourrait servir à l'élaboration d'un modèle conceptuel des processus bactériens intervenant dans les tapis microbiens.

En outre, bon nombre de micro-organismes, qu'ils soient phototrophes comme les cyanobactéries ou non phototrophes comme les bactéries sulfato-réductrices, participent à la formation des tapis microbiens dans les sédiments (Stal *et al.* 1985; de Wit & Caumette, 1994). Or, ce travail a été focalisé sur l'étude de deux populations de bactéries phototrophes, les Chlorobiaceae et les Chromatiaceae qui, bien que fortement représentées dans les tapis microbiens, ne peuvent être dissociées des autres micro-organismes les constituant. Il serait donc intéressant de compléter ce travail par la culture de biofilms beaucoup plus complexes incluant un plus grand nombre de populations bactériennes constitutives des tapis microbiens. Il est important de noter qu'un nouveau problème se pose. Comme nous l'avons montré dans ce travail, il est possible de localiser de façon très fine, *via* l'atténuation de la lumière, et de quantifier la biomasse bactéries phototrophes dans un biofilm, *via* leurs pigments biomarqueurs. Toutefois, l'identification des micro-organismes non phototrophes nécessite l'utilisation de nouveaux marqueurs moléculaires. Bien que ces nouveaux marqueurs de type lipides ou sondes ADN spécifiques, soient de plus en plus utilisés pour l'identification des communautés bactériennes pélagiques (Casamayor *et al.* 2001 ; Achenbach *et al.* 2001), ils ont rarement été appliqués à ce jour dans les systèmes sédimentaires.

Certaines bactéries phototrophes sulfo-oxydantes, et notamment quelques espèces de Chlorobiaceae se retrouvent à la fois dans la colonne d'eau et dans les couches sédimentaires

anoxiques plus profondes. Or, dans le cas des systèmes submergés décrits ci-dessus, la majorité des rayons IR est filtrée par la colonne d'eau. De ce fait, les conditions lumineuses au niveau des couches d'eau les plus profondes sont comparables à celles atteignant la surface du sédiment. La croissance des organismes en milieu pélagique est donc soumise aux mêmes contraintes lumineuses (peu de rayons IR) que celle des organismes se développant dans le compartiment benthique (voir chapitre III), et à des intensités lumineuses variables en fonction de la profondeur. Afin de compléter les résultats obtenus en compartiment benthique, il nous a paru intéressant d'étudier cette fois-ci, l'effet de ces conditions lumineuses sur la croissance et plus particulièrement la composition pigmentaire des Chlorobiaceae en milieu pélagique (chapitre IV).

La composition pigmentaire et l'adaptation chromatique des bactéries phototrophes sulfureuses en milieu pélagique ont fait l'objet de nombreuses études (Borrego *et al.* 1997; Borrego *et al.* 1998). De plus, grâce au couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse, il est aujourd'hui possible de caractériser les différents pigments au niveau moléculaire (Airs *et al.* 2001). Ce travail a été focalisé sur deux souches de Chlorobiaceae : *P. aestuarii*, déjà étudiée au chapitre III, et *C. phaeobacteroides*. Tandis que *C. phaeobacteroides* est essentiellement retrouvée dans les systèmes pélagiques profonds, *P. aestuarii* a été retrouvée dans le pélagos et le benthos (van Gemerden & Mas, 1995). Bien que la composition pigmentaire de ces deux souches soit aujourd'hui bien connue, elle n'avait été jusque là étudiée au niveau moléculaire, que pour très peu de conditions lumineuses différentes (Airs *et al.* in press). L'originalité de cette étude a donc été d'intégrer les paramètres qualité et intensité lumineuses en réalisant des cultures des deux souches choisies sous différentes intensités de lumière verte (0.2 à $56.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), simulant de façon la plus réaliste possible, les conditions lumineuses présentes à différentes profondeurs de la colonne d'eau. Ainsi, quelle que soit l'intensité lumineuse testée, nous avons obtenu des cultures présentant une réponse pigmentaire spécifique à chaque souche bactérienne. Contrairement à de précédentes études ayant stipulé que les formes de bactériochlorophylles estérifiées avec alcools à chaîne linéaire sont minoritaires chez les Chlorobiaceae (Caple *et al.* 1978), notre travail a montré que ces formes sont présentes chez *C. phaeobacteroides* qu'elle que soit l'intensité lumineuse, et que leur proportion augmente aux fortes intensités lumineuses.

L'ensemble de nos résultats supporte la perspective de l'utilisation des pigments bactériens comme biomarqueurs des conditions lumineuses. Cette perspective est discutée ci-dessous.

2. Implications écologiques et reconstitutions paléo-environnementales

Les bactéries phototrophes anoxygéniques sulfureuses ont longtemps été considérées comme comptant parmi les bactéries les plus primitives du monde vivant. Toutefois, du fait de la complexité de leur appareil photosynthétique, ce caractère primitif des bactéries phototrophes anoxygéniques a été contesté (Amesz, 1999). Finalement, de récentes études génomiques, ont démontré que la photosynthèse anoxygénique était bien un processus antérieur à celui de la photosynthèse oxygénique (Chen *et al.*, 2001). On peut ainsi émettre l'hypothèse selon laquelle les bactéries phototrophes sulfo-oxydantes seraient apparues antérieurement aux bactéries oxygéniques, et auraient donc été parmi les premiers micro-organismes vivants à se développer et à coloniser les écosystèmes aquatiques.

Comme nous venons de le voir, ce travail a montré que ces micro-organismes généralement rencontrés dans des environnements très peu profonds, sont capables de se développer dans des sédiments submergés où ils sont identifiés par leurs contenus en pigments biomarqueurs. Ils sont aussi capables d'adapter leur composition pigmentaire en fonction des conditions lumineuses. Or, la conservation des bactériochlorophylles et caroténoïdes dans les sédiments, témoignant de l'activité bactérienne à une époque révolue, n'est plus à démontrer. Ainsi, plusieurs auteurs ont confirmé l'émergence et l'utilité des proxies pigmentaires pour les reconstitutions paléo-environnementales (Repeta, 1993; Sinninghe Damsté *et al.* 1993, Rousset *et al.* 1996). A la vue de ces différentes observations, on peut aisément envisager l'apparition et l'existence des bactéries sulfureuses vertes et pourpres lors du dernier cycle climatique, où les environnements aquatiques ont été soumis à de fortes variations du niveau de la colonne d'eau (succession de périodes glaciaires et interglaciaires).

Références bibliographiques

- Achenbach, L. A., Carey J. & Madigan M.T. 2001. Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 2922-2926.
- Airs, R.L., Atkinson J.E. & Keely B.J.K. 2001. Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *J. Chromatogr. A* **917**: 167-177.

- Airs, R., Borrego C.M., Garcia-Gil J. & Keely B.J. Identification of the bacteriochlorophyll homologues of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6053 grown at light limitation. *Photosynth. Res.* In press.
- Amesz, J. 1999. Conférence d'honneur. IVth workshop on Green and Heliobacteria. Girona, (Espagne), Août 1999.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Cristina X.P., Vila X., & Abella C.M. 1998. Occurrence of a new bacteriochlorophyll *d* forms in natural populations of green photosynthetic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 257-267.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Vila X., Cristina X.P., Figueras J.B. & Abella C.M. 1997. Distribution of bacteriochlorophyll homologs in natural populations of brown-colored phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 301-309.
- Caple, M.B., Chow H., & Strouse C.E.. 1978. Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria. *J. Biol. Chem.* **253**(19): 6730-6737.
- Casamayor, E. O., Muyzer G. & Pedrós-Alió C. 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **25**: 237-246.
- Casamayor, E.O., Schäfer H., Bañeras L., Pedrós-Alió C. & Muyzer G. 2000. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from two Neighboring Sulfurous Lakes : Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 499-508.
- Chen, N., Bianchi T.S., McKee B.A. & Bland J.M. 2001. Historical trends of hypoxia on the Louisiana shelf: application of pigments as biomarkers. *Organic Geochemistry* **32**: 543-561.
- de Wit, R. & Caumette P. 1994. Diversity of and interactions among sulphur bacteria in microbial mats, p.377-392. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- Pringault, O., de Wit R. & Kühl M. 1999. A Microsensor Study of the Interactions between Purple Sulfur and Green Sulfur Bacteria in Experimental Benthic Gradients. *Microb. Ecol.* **37**: 173-184.
- Pringault O, Kühl M, de Wit R & Caumette P. 1998. Growth of green sulphur bacteria in experimental benthic oxygen, sulphide, pH and light gradients. *Microbiology* **144**: 1051-1061

- Pringault, O., de Wit R., & Caumette P. 1996. A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 237-250.
- Repeta, D.J. 1993. A high resolution historical record of Holocene anoxygenic primary production in the Black sea. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **57**: 4337-4342.
- Rousset, C., Jacq V.A. & Magnan N. Reconstitution des conditions paléo-environnementales du dépôt du soufre oligocène des Camoins, à Marseille (Bouches-du-Rhône, France) ; rôle de bactéries dans la constitution et dans l'évolution des sédiments d'une lagune continentale aux eaux sulfatées. *Bull. Soc. géol. Fr.* **3**: 375-388.
- Sinninghe Damsté, J.S., Wakeham S.G., Khonen M.E.L., Hayes J.M. & de Leeuw J.W. 1993. A 6000-year sedimentary record of chemocline excursions in the Black Sea. *Nature* **362**: 827-829.
- Stal, L.J., van Gemerden H. & Krumbein W.E. 1985. Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 111-125.
- van Gemerden H. and Mas J. (1995) Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria, p. 49-85. *In*, R.E. Blankenship, M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds) *Advances in photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London

BIBLIOGRAPHIE

- Abella, C., Montesinos E. & Guerrero R. 1980. Field studies on the competition between purple and green sulfur bacteria for available light (Lake Siso, Spain), p. 173-181. *In*, M. Dokulil, H. Metz and D. Jewson (eds). *Developments in Hydrobiology*, vol. 3. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague.
- Achenbach, L. A., Carey J. & Madigan M.T. 2001. Photosynthetic and Phylogenetic Primers for Detection of Anoxygenic Phototrophs in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 2922-2926.
- Aguilera, J. Jiménez C., Figueroa F.L., Lebert M. & Häder D.P. 1999. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48**: 75-82.
- Airs, R.L., Atkinson J.E. & Keely B.J.K. 2001. Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *J. Chromatogr. A* **917**: 167-177.
- Airs, R. Borrego C.M., Garcia-Gil J. & Keely B.J. Identification of the bacteriochlorophyll homologues of *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6053 grown at light limitation. *Photosynth. Res.* In press.
- Amesz, J. 1999. Conférence d'honneur. IVth workshop on Green and Heliobacteria. Girona, (Espagne), Août 1999.
- Amesz, J., Duysens L.N.M., & Brandt D.C. 1961. Methods for measuring and correcting the absorption spectrum of scattering suspensions. *J. Theoret. Biol.* **1**: 59-74.
- Anning, T., MacIntyre H.L., Pratt S.M., Sammes P.J., Gibb S. & Geider R. 2000. Photoacclimatation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* **45**(8): 1807-1817.
- Berner, R.J. 1980. *Early diagenesis: a theoretical approach*. Princeton University Press (eds), Prinetone, New Jersey.
- Biebl, H. & Pfennig N. 1979. Anaerobic CO₂ uptake by phototrophic bacteria. A review. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.* **12**: 48-58.
- Biebl, H. & Pfennig N. 1978. Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **117**: 9-16

- Blankenship, R.E., Olson J.M., & Miller M. 1995. Antenna complexes from green photosynthetic bacteria, p. 399-435. In R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Borrego, C.M., Gerola P.D., Miller M; & Cox R.P. 1999 (a). Light intensity effects on pigment composition and organisation in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Photosynth. Res.* **59**: 159-166.
- Borrego, C.M., Arellano J.B., Abella C.A., Gillbro T., & Garcia-Gil J. 1999 (b). The molar extinction of bacteriochlorophyll *e* and the pigment stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides*. *Photosynth. Res.* **60**: 257-264.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Cristina X.P., Vila X., & Abella C.M. 1998. Occurrence of a new bacteriochlorophyll *d* forms in natural populations of green photosynthetic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**: 257-267.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Vila X., Cristina X.P., Figueras J.B. & Abella C.M. 1997. Distribution of bacteriochlorophyll homologs in natural populations of brown-colored phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 301-309.
- Borrego, C.M. 1996. Heterogeneitat pigmentària en els bacteris fotosintètics verds. Fisiologia i dignificació ecològica. Tesi Doctoral, Universitat de Girona, 211 p.
- Borrego, C.M. & Garcia-Gil J. 1995. Rearrangement of light harvesting bacteriochlorophyll homologues as a response of green sulfur bacteria to low light intensities. *Photosynth. Res.* **45**: 21-30.
- Borrego, C.M. & Garcia-Gil J. 1994. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth. Res.* **41**: 157-163.
- Borrego, C.M., Garcia-Gil L.J., Bañeras L. & Brunet R.C. 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of Lake Banyoles (Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 720-725.
- Bosshard, P.P., Santini Y., Grüter D., Stettler R. & Bachofen R. 2000. Bacterial diversity and community in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 173-182.
- Bouldin, D. 1968. Models describing the diffusion of oxygen and other mobile constituents across the mud-water interface. *J. Ecol.* **56**: 429-455.
- Broecker, W.S. & Peng T.H. 1974. Gas exchange rates between air and sea. *Tellus* **26**: 21-35.

- Bustillos-Guzmán, J., López-Cortés D. Hernandez F. & Murillo I. 2000. Pigment signatures associated with an anoxic coastal zone: Bahia Concepcion, Gulf of California. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **249**: 77-88.
- Caple, M.B., Chow H., & Strouse C.E.. 1978. Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria. *J. Biol. Chem.* **253**(19): 6730-6737.
- Casamayor, E. O., Muyzer G. & Pedrós-Alió C. 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **25**: 237-246.
- Casamayor, E. O., Núñez-Cardona M.T., Calderón-Paz J.I., Mas J. & Pedrós-Alió C. 2000 (a). Comparison of pure cultures and natural assemblages of planktonic photosynthetic sulfur bacteria by low molecular mass RNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 25-34.
- Casamayor, E.O., Schäfer H., Bañeras L., Pedrós-Alió C. & Muyzer G. 2000 (b). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from two Neighboring Sulfurous Lakes : Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 499-508.
- Casamayor, E. O., Calderón-Paz J.I , Mas J. & Pedrós-Alió C. 1998. Identification of phototrophic sulfur bacteria through the analysis of ImwRNA band patterns. *Arch. Microbiol.* **170**: 269-278.
- Castenholz, R.W., Bauld J. & Jørgensen B.B. 1990. Anoxygenic microbial mats of hot springs :thermophilic *Chlorobium* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 325-336.
- Caumette, P., Matheron R, Welsh D.T., Herbert R.A. & de Wit R. 1999. Ecology and osmoadaptation of halophilic Chromatiaceae in hypersaline environments, p. 707-713. *In*, Peschek *et al.* (eds), *The Phototrophic Prokaryotes : Proceedings of the Ninth Symposium on Phototrophic psychrophilic purple bacteria from Antarctica.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Caumette, P., Imhoff J.F., Süling J. & Matheron R. 1997. *Chromatium glycolicum* sp. nov., a moderately halophilic purple bacterium that uses glycolate as substrate. *Arch. Microbiol.* **167**: 11-18.
- Caumette, P., Matheron R., Raymond N. & Relexans J.C. 1994. Microbial mats in the hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Giraud, France). *FEMS Microb. Ecol.* **13**: 273-286.

- Caumette, P. 1989. Ecology and General Physiology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria in Benthic Environments, p. 283-304. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- Caumette, P. 1987. Rôle des bactéries phototrophes et des bactéries sulfato-réductrices dans les milieux lagunaires. Thèse. Editions de l'Orstom, collection Etudes et Thèses, Paris. 304p.
- Caumette, P., C. Schmidt, H. Biebl, and N. Pfennig. 1985. Characterization of a *Thiocapsa* strain containing okenone as major carotenoid. *System. Appl. Microbiol.* **6**: 132-136.
- Caumette, P. & Baleux B. 1980. Etude des eaux rouges dues à la prolifération des bactéries photosynthétiques sulfo-oxydantes dans l'Etang du Prévost, lagune saumâtre méditerranéenne. *Marine Biology* **56**: 183-194.
- Chen, N., Bianchi T.S., McKee B.A. & Bland J.M. 2001. Historical trends of hypoxia on the Louisiana shelf: application of pigments as biomarkers. *Organic Geochemistry* **32**: 543-561.
- Cogdell, R. & Gardiner A.T. 2001. Light harvesting by purple bacteria: a circular argument. *Microbiology Today* **28**: 120-122.
- de Wit, R. 2000. Sulfide-Containing Environments, p. 478-493. *In*, Encyclopedia of Microbiology, volume 4, second edition; Academic Press.
- de Wit, R., van den Ende F.P. & van Gemerden H. 1995. Mathematical simulation of the interactions among cyanobacteria, purple sulfur bacteria and chemotrophic sulfur bacteria in microbial mats communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 117-136.
- de Wit, R. & Caumette P. 1994. Diversity of and interactions among sulphur bacteria in microbial mats, p.377-392. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- de Wit, R., & H. van Gemerden. 1990. Growth and metabolism of the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* under combined light/dark and oxic/anoxic regimens. *Arch. Microbiol.* **154**: 459-464.
- de Wit, R. 1989. Interactions between phototrophic bacteria in marine sediments. Ph. D Thesis. University of Groningen. 143p.
- de Wit, R., & H. van Gemerden. 1987. Chemolithotrophic growth of the phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 117-126.

- Eckert, W., Frevert T., Bergstein-Ben Dan T. & Cavari B.Z. 1986. Competitive development of *Thiocapsa roseopersicina* and *Chlorobium phaeobacteroides* in Lake Kinneret. *Can. J. Microbiol.* **32**: 917-921.
- Eichler, B. & Pfennig, N. 1988. A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter purpureus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **149**: 395-400.
- Eichler, B. & Pfennig N. 1986. Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pedioformis* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**: 295-300.
- Epping E, Khalili A and Thar R (1999) Photosynthesis and the dynamics of oxygen consumption in a microbial mat as calculated from transient oxygen microprofiles. *Limnol Oceanogr.* **44** (8): 1936-1948
- Fenchel, T. & Kühl M. 2000. Artificial Cyanobacterial Mats : Growth, Structure, and Vertical Zonation Patterns. *Microb. Ecol.* **40**: 85-93.
- Fenchel, T. 1998. Formation of laminated microbial mats in the absence of benthic fauna. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**: 235-240.
- Foppen, F. H. 1971. Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* **14**: 133-298.
- Frigaard, N-U. & Matsuura K. 1999. Oxygen uncouples light absorption by the chlorosome antenna and photosynthetic electron transfer in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochimica et Biophysica. Acta.* **1412**: 108-117.
- Frigaard, N-U. 1997. Light-harvesting Structures in Green Sulfur Bacteria, Ph.D. thesis, Odense University, Odense, Denmark.
- Garcia-Gil, L.J., Vicente E., Camacho A., Borrego C.M., Vila X., Cristina X.P. & Rodriguez-Gonzalez J. 1999. Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in Lake 'El Tobar' (Cuenca, Spain). *Aquat. Microb. Ecol.* **20**: 299-303.
- Gregory, R.P.F. 1989. *Biochemistry of Photosynthesis*, Third edition. John Wiley and sons (eds.). Bath Press, Great Britain, 257 p.
- Goni-Urriza, M., de Montaudouin X., Guyoneaud R. Bachelet G. & de Wit R. 1999. Effect of macrofaunal bioturbation on bacterial distribution in marine sandy sediments, with special reference to sulphur-oxidising bacteria. *Journal of Sea Research* **41**: 269-279.
- Guerrero, M. C., Tadeo A.B. & de Wit R. 1994. Environmental factors controlling the development of microbial mats in inland saline lakes; the granulometric composition of the sediment, p. 85-90. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats*:

- Structure, Development, and Environmental Significance. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- Guerrero, R. & Mas J. 1989. Multilayered Microbial Communities in Aquatic Ecosystems : Growth and Loss Factors, p. 37-49. In Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- Guilizzoni, P., Lami A., Ruggiu D. & Bonomi G. 1986. Statigraphy of specific algal and bacterial carotenoids in the sediments of Lake Varese (N. Italy). *Hydrobiologia* **143**: 321-325.
- Guyoneaud, R., Borrego C., Martínez-Planells A., Buitenhuis E.T. & Garcia-Gil L.J. 2001. Light responses in the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*: changes in prosthecae length, ultrastructure, and antenna pigment composition. *Arch. Microbiol.* **176**: 278-284.
- Guyoneaud, R., Süling J., Petri R., Matheron R., Caumette P., Pfennig N., & Imhoff J.F. 1998. Taxonomic rearrangements of the genera *Thiocapsa* and *Amoebobacter* on the basis of 16S rDNA sequence analyses, and description of *Thiolamprovum* gen.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **48**: 957-964.
- Guyoneaud, R., de Wit R., Matheron R. & Caumette P. 1998. Impact of macroalgal dredging on dystrophic crises and phototrophic bacterial blooms (red waters) in a brackish coastal lagoon. *Oceanologica Acta* **21**(4).
- Guyoneaud, R., Matheron R., Baulaigue R., Podeur K., Hirschler A. & Caumette P. 1996. Anoxygenic phototrophic bacteria in eutrophic coastal lagoons of the French Mediterranean and Atlantic Coasts (Prévost Lagoon, Arcachon Bay, Certes Fishponds). *Hydrobiologia* **329**: 33-43.
- Guyoneaud, R. 1996. Étude écologique, physiologique et systématique des communautés de bactéries phototrophes anoxygéniques en milieu lagunaire méditerranéen et atlantique. Thèse Université de Bordeaux 1 (n°1387), 225p.
- Harimoto, T., Ishizaka J., & Tsuda R. 1999. Latitudinal and vertical distribution of phytoplankton absorption spectra in the central North Pacific during spring 1994. *Journal of Oceanography* **55**(6): 667-679.
- Hartgers, W A, Schouten S., Lopez, J F, Sinninghe Damsté, J S & Grimalt, J.O. 2000. ¹³C-contents of sedimentary bacterial lipids in a shallow sulfidic monomictic lake (Lake Ciso, Spain). *Organic Geochemistry* **31**: 777-786.

- Hoffmann, C. 1949. Über die Durchlässigkeit dünner Sandschichten für Licht. *Planta*, Bd. **36**: 48-56.
- Hoffmann, C. 1942. Beiträge zur Vegetation des Farbstreifen-Sandwatt. *Kieler Meeresforsch* **4**: 85-108.
- Imhoff, J. F. 1995. Taxonomy and Physiology of phototrophic Purple Bacteria and Green Sulfur Bacteria, p. 1-15. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Jeroschewski, P., Steuckart C., & Kühl M. 1997. An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Anal. Chem.* **24**: 4351-4357.
- Jonkers, H. M., de Bruin S. & van Gemerden H. 1998. Turnover of dimethylsulfonopropionate (DMSP) by the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* M11 : ecological implications. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 281-290.
- Jorgensen, B. B. & Des Marais D.J. 1986. Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 179-186.
- Kirk, J.T.O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Koch, A.L. 1990. Diffusion; The Crucial Process in Many Aspects of the Biology of Bacteria. p. 37-70. *In* K.C. Marshall (ed) *Advances in Microbial Ecology Volume 11*. Plenum Press, New York and London
- Kühl, M. & Fenchel T. 2000. Bio-optical Characteristics and the Vertical Distribution of Photosynthetic Pigments and Photosynthesis in an Artificial Cyanobacterial Mat. *Microb. Ecol.* **40**: 94-103.
- Kühl, M. & Jørgensen B.B. 1994. The light field of microbenthic communities : Radiance distribution and microscale optics of sandy coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.* **39**(6): 1368-1398.
- Kühl, M., & Jørgensen B.B. 1994. Light penetration and light intensity in sandy marine sediments measured with irradiance and scalar irradiance fiber-optic microprobes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **105**: 139-148.
- Kühl, M., & Jørgensen B.B. 1992. Spectral light measurements in microbenthic phototrophic communities with a fiber-optic microprobe coupled to a sensitive diode array detector. *Limnol. Oceanogr.* **37** (8): 1813-1823.

- Lambersten Larsen, K., Cox R.P. & Miller M. 1994. Effects of illumination intensity on bacteriochlorophyll *c* homolog distribution in *Chloroflexus aurantiacus* grown under controlled conditions. *Photosynth. Res.* **41**: 151-156.
- Lemaire, E., Abril G., de Wit R., & Etcheber H. Distribution of phytoplankton pigments in nine European estuaries and implications for an estuarine typology. *Biogeochemistry*, in press.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* **193**: 265-275.
- Madigan, M.T., Martinko J.M. & Parker, J. 2000. Brock, *Biology of anaerobic microorganisms*. Ninth Edition,, Prentice Hall, New Jersey. 991 p.
- Madigan, M.T., & Ormerod J.G. 1995. Taxonomy, Physiology and Ecology of Heliobacteria, p. 17-30. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Massé, A., Pringault O., & de Wit R. Effect of light quality on sulfide photo-oxidation and growth in an artificial biofilm of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. *Photosyn. Res.*, in press.
- Massé, A. 1998. Adaptation chromatique des bactéries du cycle du soufre: Étude en vue de l'utilisation des pigments comme biomarqueurs des paléoenvironnements aquatiques. DEA, Université Bordeaux 1, 31p.
- Melø, T. B., Frigaard N.U., Matsuura K & Razi Naqvi. 2000. Electronic energy transfer involving carotenoids pigments in chlorosomes of two green bacteria: *Chlorobium tepidum* and *Chloroflexus aurantiacus*. *Spectrochimica Acta Part A* **56**: 2001-2010.
- Millero, F.J. 1986. The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar Chem* **18**: 121-147
- Montesinos, E., Guerrero R. Abella C. & Esteve I. 1983. Ecology and Physiology of the Competition for Light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(5): 1007-1116.
- Navarrete, A., Peacock A., Macnaughton S.J., Urmeneta J. Mas-Castellà, White D.C. & Guerrero R. 2000. Physiological Status and Community Composition of Microbial Mats of the Ebro Delta, Spain, by Signature Lipid Biomarkers. *Microb. Ecol.* **39**: 92-99.
- Nicholson, J.A., Stolz J.F., & Pierson B.K. 1987. Structure of microbial mat at Great Sippewissett Marsh, Cape Cod, Massachussets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 343-364.

- Nielsen, L.P., Christensen P.B., Revsbech N.P. & Sorensen J. 1990. Denitrification and oxygen respiration in biofilms studied with a microsensor for nitrous oxid and oxygen. *Microb. Ecol.* **19**: 63-72.
- Overmann, J. & van Gemerden H. 2000. Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 591-599.
- Overmann, J., Coolen M.J.L. & Tuschak C. 1999. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA genes fragments. *Arch. Microbiol.* **172**: 83-94.
- Overmann, J., Hall K.J., Northcote T.G. & Beatty J.T. 1999. Grazing of the copepod *Diaptomus connexus* on purple sulphur bacteria in a meromictic salt lake. *Environ. Microbiol.* **1**(3): 213-221.
- Overmann, J., Beatty J. T., Krouse H.R. & Hall K.J. 1996. The sulphur cycle in the chemocline of a meromictic salt lake. *Limnol. Oceanogr.* **41**(1): 147-156.
- Overmann, J., Beatty J. T. & Hall K.J. 1994. Photosynthetic activity and population dynamics of *Amoebobacter purpureus* in a meromictic saline lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 309-320.
- Overmann, J., Cypionka H. & Pfennig N. 1992. An extremely low-light adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black-Sea. *Limnol. Oceanogr.* **37**(1): 150-155.
- Overmann, J. & Pfennig N. 1992. Continuous chemotrophic growth and respiration of Chromatiaceae species at low oxygen concentrations. *Arch. Microbiol.* **158**: 59-67.
- Overmann, J., Beatty, J.T., Hall, K.J., Pfennig, N. & Northcote, T.G. 1991. Characterization of a dense, purple sulfur bacterial layer in a meromictic salt lake. *Limnol. Oceanogr.* **36**(5): 846-859.
- Palenik, B. 2001. Chromatic adaptation in Marine *Synechococcus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 991-994.
- Pedrós-Alió, C., Montesinos E. & Guerrero R. 1983. Factors Determining annual Changes in Bacterial Photosynthetic Pigments in Holomictic Lake Ciso, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(5): 999-1006.
- Pfennig, N. & H.G. Trüper. 1992. The family Chromatiaceae. In Balows A, Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K.H. (eds). *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New-York: 3200-3221.

- Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria, p. 3-18. *In* R.K. Clayton & W.R. Sistrom (eds), *The Photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York and London.
- Pfennig, N. 1975. The phototrophic bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant and Soil* **43**: 1-16.
- Pierson, B. K. & Parenteau N.M. 2000. Phototrophs in high iron microbial mats : microstructure of mats in iron-depositing hot springs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**: 181-196.
- Pierson, B. K., Sands V.M. & Frederick J.L. 1990. Spectral Irradiance and Distribution of Pigments in a Highly Layered Marine Microbial Mat. *Appl. Env. Microbiol.* **56**(8): 2327-2340.
- Pierson, B.K., & Olson J.M. 1989. Evolution of photosynthesis in anoxygenic photosynthetic prokaryotes, p. 402-427. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (eds) *Microbial Mats; Physiological ecology of benthic microbial communities*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Pierson, B., Oesterle A. & Murphy G.L. 1987. Pigments, light penetration, and photosynthesis activity in the multi-layered microbial mats of Great Sippewissett Salt Marsh, Massachusetts." *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**: 365-376.
- Pringault, O., Epping E., Guyoneaud R. Khalili A. & Kühl M. 1999 (a). Dynamics of anoxygenic photosynthesis in an experimental green sulphur bacteria biofilm. *Environ. Microbiol.* **1**(4): 295-305.
- Pringault, O., de Wit R. & Kühl M. 1999 (b). A Microsensor Study of the Interactions between Purple Sulfur and Green Sulfur Bacteria in Experimental Benthic Gradients. *Microb. Ecol.* **37**: 173-184.
- Pringault O, Kühl M, de Wit R & Caumette P. 1998. Growth of green sulphur bacteria in experimental benthic oxygen, sulphide, pH and light gradients. *Microbiology* **144**: 1051-1061
- Pringault, O., de Wit R., & Caumette P. 1996. A benthic gradient chamber for culturing phototrophic sulfur bacteria on reconstituted sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 237-250.
- Rasmussen, H. & Jørgensen B.B. 1992. Microelectrode studies of seasonal oxygen uptake in a coastal sediment: role of molecular diffusion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **81**: 289-303.
- Repeta, D.J. 1993. A high resolution historical record of Holocene anoxygenic primary production in the Black sea. *Geochimica and Cosmochimica Acta* **57**: 4337-4342.

- Revsbech, N. P. 1989. An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol. Oceanogr.* **34**: 472-476.
- Revsbech, N. P., & Jørgensen B.B. 1986. Micro-electrodes. Their use in microbial ecology. *Adv. Microbiol. Ecol.* **9**: 293-352.
- Rodrigo, M.A., Camacho A., Vicente E. & Miracle M.R. 1999. Microstratified distribution and migration of phototrophic microorganisms during a diel cycle in Lake Arcas-2 (Spain). *Arch. Hydrobiol.* **145**(4): 497-512.
- Rousset, C., Jacq V.A. & Magnan N. Reconstitution des conditions paléo-environnementales du dépôt du soufre oligocène des Camoins, à Marseille (Bouches-du-Rhône, France) ; rôle de bactéries dans la constitution et dans l'évolution des sédiments d'une lagune continentale aux eaux sulfatées. *Bull. Soc. géol. Fr.* **3**: 375-388.
- Sanchez, O. & Mas J. 1999. Kinetics of photoacclimation in cultures of *Chromatium vinosum* DSM 185 during shifts in light irradiance. *Microbiology* **145**: 827-833.
- Sanchez, O., van Gemerden H. & Mas J. 1998. Acclimation of the photosynthetic response of *Chromatium vinosum* to light-limiting conditions. *Arch. Microbiol.* **170**: 405-410.
- Schaub, B. E. M. & van Gemerden H. 1996. Sulfur bacteria in sediments of two coastal ecosystems: the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost, France. *Hydrobiologia* **329**: 199-210.
- Schaub, B.E.M., and H. van Gemerden. 1994. Simultaneous phototrophic and chemotrophic growth in the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* M1. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**: 185-196.
- Schmidt, K. A., Neerken S, Permentier H.P., Hager-Braun, C & Amesz J. 2000. Electron transfer in Reaction Center Core Complexes from the Green Sulfur Bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium tepidum*. *Biochemistry* **39**: 7212-7220.
- Schmidt, K. 1978. Biosynthesis of carotenoids, p. 729-750. *In* R.K. Clayton & W.R. Sistrom (eds), *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York.
- Schmidt, K.A. *et al.* 1994. Analysis of Pigments carotenoids and Related Polyenes, p. 403-461. *In* M. Goodfellow & A.G. O'Donnell (eds), *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. John Wiley & Sons.
- Schopf, J.W., & Walter M.R. 1982. Origin and early evolution of cyanobacteria: The geological evidence, p. 543-564 *In* N.G. Carr and B.A. Whitton (eds), *The Biology of the cyanobacteria*. Blackwell, Oxford.
- Senge, M.O. & Smith K.M. 1995. Biosynthesis and structures of bacteriochlorophylls, p. 137-151 *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in*

- Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.
- Siefert, E. & Pfennig N. 1984. A convenient method to prepare neutral sulfide solution for cultivation of phototrophic sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **139**: 100-101.
- Sinninghe Damsté, J.S., Wakeham S.G., Khonen M.E.L., Hayes J.M. & de Leeuw J.W. 1993. A 6000-year sedimentary record of chemocline excursions in the Black Sea. *Nature* **362**: 827-829.
- Smith, K.M. 1994. Nomenclature of the bacteriochlorophylls *c*, *d*, and *e*. *Photosynth. Res.* **41**: 23-26.
- Stal, L.J. 1994. Microbial mats in coastal environments, p. 21-32. *In*, L.J. Stal and P. Caumette (eds), *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- Stal, L. J. & Caumette P. 1993. *Microbial Mats: Future Research Developments*, p. 147-152. *In*, R. Guerrero and C. Pedros-Alio (eds), *Trends in Microbial Ecology: Proceedings on the Sixth International Symposium on Microbial Ecology*, Barcelona, Spanish Society for Microbiology.
- Stal, L.J., van Gemerden H. & Krumbein W.E. 1985. Structure and development of a benthic marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 111-125.
- Stal, L. J., van Gemerden H., & Krumbein W.E. 1984. The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *J. Microbiol. Meth.* **2**: 295-306.
- Steensgard, D., van Walree C.A., Permentier H. Bañeras L, Borrego C.M., Garcia-Gil J., Aartsma T.J., Amesz J & Holzwarth A.R. 2000. Fast energy transfer between Bchl *d* and BChl *c* in chlorosomes of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochimica and Biophysica Acta* **1457**: 71-80.
- Steensgard, D., van Walree C.A., Bañeras L, Borrego C.M., Garcia-Gil J. & Holzwarth A.R. 1999. Evidence for spatially separate bacteriochlorophyll *c* and bacteriochlorophyll *d* pools within the chlorosomal aggregate of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Photosynth. Res.* **59**: 231-241.
- Steiger, S., Schäfer L. & Sandmann G. 1999. High-light dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **52**: 14-18.
- Sybesma, C. & Olson J.M. 1963. Transfer of chlorophyll excitation energy in green photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **49**: 248-253.

- Stryer, L. 1995. Biochemistry, fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York. 1064 p.
- Tokita, S., Hirota M., Frigaard N.P., Shimada K & Matsuura K. 1999. Pheophytinization of bacteriochlorophyll *c* and energy transfer in cells of *Chlorobium tepidum*. Arch. Microbiol. **172**: 40-44.
- Trüper H.G., & Pfennig N. 1992. The family Chlorobiaceae, p. 3583-3592. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder. & K.H Schleifer (eds.), The Prokaryotes. Springer-Verlag, New-York.
- Ullman, W.S. & Aller R.C. 1982. Diffusion coefficients in nearshore marine sediments. Limnol. Oceanogr. **27**: 552-556.
- van den Ende, F. P & van Gemerden H. 1994. Relationships between functional groups of organisms in microbial mats, p. 339-355. In, L.J. Stal and P. Caumette (eds), Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance. NATO ASI Series vol. 35, Springer-Verlag. Berlin.
- van Gemerden H. and Mas J. (1995) Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria, p. 49-85. In, R.E. Blankenship, M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds) Advances in photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London
- van Gemerden, H. 1993. Microbial Mats : A joint venture. Marine Geology **113**: 3-25.
- van Gemerden, H. & de Wit R. 1989. Phototrophic and Chemotrophic growth of the Purple Sulfur Bacterium *Thiocapsa roseopersicina*, p. 313-319. In, Y. Cohen and E. Rosenberg (eds), Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- van Gemerden, H. 1987. Competition between purple sulfur bacteria and green sulfur bacteria: Role of sulfide, sulfur and polysulfides. Acta Academia Aboensis **47**(2): 13-27.
- van Gemerden, H. 1984. The sulfide affinity of phototrophic bacteria in relation to the location of elemental sulfur. Arch. Microbiol. **139**: 289-294.
- van Gemerden, H. & Beeftink H.H. 1981. Coexistence of *Chlorobium* and *Chromatium* in a sulfide-limited culture. Arch. Microbiol. **129**: 32-34.
- Vila, X., Abella C. A., Figueras J.B. & Hurley J.P. 1998. Vertical models of phototrophic bacterial distribution in the metalimnetic microbial communities of several freshwater North-American kettle lakes. FEMS Microbiol. Ecol. **25**: 287-299.

- Vila, X., Dokulil M., Garcia-Gil L.J., Abella C.A., Borrego C.M. & Bañeras L. 1996. Composition and distribution of phototrophic bacterioplankton in the deep communities of several central European lakes: The role of light quality. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol.* **48**: 183-196.
- Vila, X. & Abella C.A. 1994. Effect of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynth. Res.* **41**: 53-65.
- Vila, X. & Abella C.A. 1993. Comparison of light spectral distribution in some waterbodies of Banyoles area (Girona, Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 100-104.
- Ward, D. M., Weller R., Shiea J. Castenholz R.W. & Cohen Y. 1989. Hot Spring Microbial Mats: Anoxygenic and Oxygenic Mats of Possible Evolutionary Significance, p. 3-15. *In*, Y. Cohen and E. rosenberg (eds), *Microbial mats, Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. American Society for Microbiology, Washington, D C.
- Widdel, F. 1980. Anaerober abbau von fettsäuren und benzoessäure durch neue isolerte arten sulfate-reduzierenden bacterien. Ph. D Thesis, Göttingen University, Federal RG.
- Wright, S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjørnland T., Repeta D. & Welschmeyer N. 1991. Improve HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **77**: 183-196.
- Xiong, J., Kazuhito I., & Bauer C.E. 1998. Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 14851-14856.
- Young, A. & Britton G. 1993. Carotenoids in Photosynthesis. Chapman et Hall, 498 p.
- Zuber, H. & Cogdell R.J. 1995. Structure and Organization of Purple Bacterial Antenna Complexes, p. 315-348. *In* R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer (eds), *Advances in Photosynthesis Volume 2; Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London.

ANNEXES

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

COMMUNICATIONS ORALES

- A. Massé & R. de Wit. Effect of light color on bacteriochlorophyll homologue distributions and carotenoid contents in three Chlorobiaceae species. IVth Workshop on Green and Heliobacteria. Girona, 28-31 Août 1999.
- A. Massé, O. Pringault & R. de Wit. Interactions between purple and green sulfur bacteria in an experimental benthic biofilm. 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP), Barcelone, 26-31 Août 2000.
- A. Massé, O. Pringault & R. de Wit. Effect of limiting light conditions on the distribution of Green and Purple Sulfur Bacteria in an experimental benthic biofilm. Forum des Jeunes Océanographes, Arcachon, 23 mai 2001. Prix Jocelyne Marchand.
- A. Massé, R. Airs, B.J.K. Keely & R. de Wit. Pigment composition of *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium phaeobacteroides* at different green light intensities. EMBO Workshop on Green and Heliobacteria: Molecular Biology, Structure and Function. Passau, 19-24 avril 2002. Communication soumise.

Effect of light color on bacteriochlorophyll homologue distributions and carotenoid contents in three Chlorobiaceae species.

Green wavelengths dominate spectral composition in deeper layers of aquatic environments, whereas red and infrared wavelengths dominate in sediments. Thus, Chlorobiaceae are exposed in nature to a range of spectral irradiance compositions.

We have studied the effect of light colour on the growth and the pigment composition of *Chlorobium tepidum* (ATTC 49652) and *Prosthecochloris aestuarii* (CE 2404), which were isolated from microbial mats, and of *Chlorobium phaeobacteroides* (CL 1402) isolated from the pelagic environment. Growth of *Chlorobium tepidum* was strongly reduced under fluorescent compared to incandescent illumination and this species was not capable of growth under green illumination at $0.7 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pigment composition of this species was rather constant. *Chlorobium phaeobacteroides* increased its ratios of bacteriochlorophyll *a* to bacteriochlorophyll *e* and of carotenoids to bacteriochlorophyll *e* and slightly stimulated secondary homologue series of bacteriochlorophyll *e* under red + near infrared illumination compared to white and green light. *Prosthecochloris aestuarii* showed enrichment of bacteriochlorophyll *c*₂, *c*₃ and *c*₄ homologues when cultured under green light. Thus, our data show different patterns between the different strains studied so far, which suggests that adaptation to light climates is highly species-specific in Chlorobiaceae.

Interactions between purple and green sulfur bacteria in an experimental benthic biofilm.

The aim of this study was to test the effect of light quality on the photosynthetic activity in an experimental biofilm developed by a mixed culture of a purple and a green sulfur bacteria.

The experiment was carried out in a Benthic Gradient Chamber (Pringault et al, 1996), under a 16 hours light/8 hours dark regime, using visible light (400-700 nm) to simulate a submerged sediment. After 5 weeks, a biofilm was obtained in the BGC, by cultivation of *Prosthecochloris aestuarii* (strain CE 2404) and *Thiocapsa* 5811.

After the incubation period, physicochemical gradients (O_2 , H_2S , pH, radiance) were measured using microsensors. Photosynthesis was measured as sulfide oxidation activity and studied at high spatial resolution (150 μm) during short light/dark cycles, under visible (as used during the growth period) and visible enriched with infrared light.

Backscattered radiance at 750 and 800 nm was used as a proxy for the pigment containing organisms which showed a biofilm location at 0.9 and 1.5 mm under the surface. Both in visible and visible enriched with infrared light, the sulfide oxidation activity occurred as soon as the light was on, with a value of ca. 0.5-0.75 $nmol.cm^{-3}.sec^{-1}$. Sulfide oxidation activity at 0.9 mm increased gradually until a maximum value of ca. 1.5 $nmol.cm^{-3}.sec^{-1}$ after 10 minutes of light exposure in visible light, and 2.1 $nmol.cm^{-3}.sec^{-1}$ after 5 minutes, in visible enriched with infrared light.

The activity at 1.5 mm showed a maximum value of ca. 1.25 and 2.2 $nmol.cm^{-3}.sec^{-1}$ respectively after 7 and 5 minutes of light exposure in visible and visible enriched with infrared light.

In both cases, the sulfide oxidation activity decreased and remained relatively constant after the maximum value and during the left time of light exposure.

Effect of limiting light conditions on the distribution of Green and Purple Sulfur Bacteria in an experimental benthic biofilm.

Green and Purple Sulfur Bacteria (GSB and PSB) are anoxygenic phototrophic organisms that coexist in different aquatic sediments. They use light and sulfide as energy source and electron donor for photosynthesis, respectively. Whereas GSB are strict anaerobes, many PSB species can tolerate and even use oxygen. Thus, it is assumed that GSB commonly develop in the sediment below PSB, where enough light is still available for photosynthesis. In this study, we tested the effect of limiting light conditions on this bacterial distribution in the sediment.

An axenic culture of one species of GSB and one species of PSB, *Prosthecochloris aestuarii* and *Thiocapsa roseopersicina*, respectively, and a mixed culture of both species were carried out for a five-week incubation time in a benthic gradient chamber, under a 16 hours visible light / 8 hours dark regime. After the five-week period, light attenuation coefficients at 750 and 830 nm (for bacteriochlorophyll *c* and bacteriochlorophyll *a*, pigment markers for GSB and PSB, respectively) were used as a proxy for distribution and depth location of both species, as described by the model of Epping et al. (1999). Pigment contents in bacteriochlorophyll *c* (BChl *c*) and okenone were used as a proxy for *Prosthecochloris* and *Thiocapsa* density, respectively. Results in the mixed culture were compared with those obtained in the corresponding axenic cultures.

The mixed culture gave rise to a single biofilm. Both species coexisted at the same depth in the sediment (i.e. between the surface and 2.5 mm depth). Thus, no stratification was observed. However, this biofilm obtained from the mixed culture was located shallower than the axenic ones (i.e. between 1.5 and 2.5 mm depth for *Prosthecochloris*). Compared to axenic cultures, the model in the mixed culture indicates no variability and a minor decrease of bacterial density of *Prosthecochloris* and *Thiocapsa*, respectively. However, the BChl *c* increase in the mixed culture clearly indicates the advantageous effect of the latter for the green bacterium. Finally, whereas the okenone distribution of *Thiocapsa* shows a very minor decrease in the mixed culture compared to the axenic one, this is inconclusive about the effect of the mixed culture on this species abundance.

Key words: biofilm; mixed culture; pigment; *Prosthecochloris aestuarii*; *Thiocapsa roseopersicina*

Pigment composition of *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium phaeobacteroides* at different green light intensities

Two green sulfur bacteria, i.e. *Prosthecochloris aestuarii* strain CE 2404 and *Chlorobium phaeobacteroides* strain UdG 6030 were grown in liquid cultures under green light (480 - 615 nm) under a range of light intensities (0.2, 0.8, 1.2, 3.5, 4.3, 6, 9.2, 40 and 55.7 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). These conditions reflect the light climate occurring in the water column at different depths. The pigment composition was determined by Liquid Chromatography coupled both to UV-Vis spectrometry (LC-UVvis) and to mass spectrometry (LC-MS).

The growth rates of *P. aestuarii* under green light achieved a maximum of 0.06 h^{-1} at light intensities exceeding $6 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which is lower than the maximum observed under white light (approximately 0.1 h^{-1}). Under green light, the maximal growth rates of *C. phaeobacteroides* were slightly higher (0.07 h^{-1}) than observed for *P. aestuarii* and were achieved at 3.5 and $4.3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ green light. The BChl. *c* homologues of *P. aestuarii* were mainly farnesyl esterified forms (> 90 %). The different farnesyl esterified BChl. *c* homologues differed by mass with multiples of 14 daltons (-CH₂-) and their proportion varied as a function of the light intensity. The specific content of total BChl. *c* increased up to four fold with decreasing light. But while a maximum value of $488 \mu\text{g BChl. c} / \text{mg protein}$ was observed at $3.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, at still lower intensities both the specific contents and the specific growth rates dropped off. For, *C. phaeobacteroides*, the specific contents of BChl. *e* were maximal at $4.3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($54.5 \mu\text{g BChl. e} / \text{mg protein}$), but this species was characterised by high carotenoid (isorenieratene) contents. The major BChl. *e* forms were esterified with a whole range of isoprenoid and straight chain alcohols. The isoprenoid alcohols mainly comprised farnesol and to a lesser extent geranylgeranol. The straight chain alcohols included C₁₅, C_{15:1}, C₁₆, C_{16:1}, and C₁₇. Interestingly, the proportion of straight alkyl chain and isoprenoid esterified side chains shifted spectacularly with light intensity. Thus, the isoprenoid side chains dominated at low light intensities, while the straight chain alkyl substituents dominated at higher light intensities. This phenomenon may be explained as a result of changing availability of reducing power, i.e. the highly reduced straight chain alcohols have a higher biosynthetic demand for NADPH₂ than the poly-unsaturated isoprenoid of the same number of C atoms.

POSTER

A.Massé, O.Pringault & R. de Wit. Analyses of Anoxygenic Photosynthesis in an experimental benthic biofilm of a green sulfur bacterium. International Symposium on the Interface between Analytical Chemistry and Microbiology (ISIAM), Trégastel, 4-7 juin 2000.

Analyses of anoxygenic photosynthesis in an experimental biofilm of a green sulfur bacterium

The aim of this study was to test the effect of light on the photosynthetic activity in a cultured biofilm of the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. The experiment was carried out in a Benthic Gradient Chamber (Pringault *et al.* 1996), under a 16 hours light / 8 hours dark regime, using visible (400-700 nm) to simulate a submerged sediment. After 5 weeks, a biofilm was obtained in the BGC, by cultivation of *Prosthecochloris aestuarii* (strain CE 2404).

After the incubation period, physicochemical gradients (O_2 , H_2S , pH, radiance) were measured using microsensors. Photosynthesis was measured as sulfide oxidation activity and studied at high spatial resolution (150 μm) during short light / dark cycle, under visible (as used during the growth period) and visible enriched with infrared light. Backscattered radiance at 750 and 800 nm was used as a proxy for the pigment-containing organism which showed that the biofilm was located between 2 and 2.5 mm under the surface. Sulfide oxidation activity at 2.1 mm showed a lag-phase of 10 minutes before reaching a maximum value of ca. $2.5 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $0.75 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$, in visible enriched with infrared and visible light, respectively. After 10 minutes, the oxidation activity in visible enriched with infrared light decreased gradually until ca. $0.3 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$. In visible light, the activity was very low ($0.5 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$) and remained relatively constant during the 30 minutes of light exposure.

Analyses of Anoxygenic Photosynthesis in an experimental benthic biofilm of a green sulfur bacterium.

Astrid Massé, Olivier Pringault and Rutger de Wit

Laboratoire d'Océanographie Biologique CNRS-UMR 5805 Université Bordeaux 1, 2, rue du Prof. Jolyet. F-33120 Arcachon, France.

INTRODUCTION

Anoxygenic phototrophic bacteria are commonly found in different illuminated aquatic ecosystems at low, medium or high salinity. Among this group, Green Sulfur Bacteria (GSB) are strict anaerobes. They require H₂S and low infrared light intensity for growth. They can form dense populations in the water column and sediments of stratified systems.

The aim of this study was to test the effect of light quality on the growth and photosynthetic activity of an experimental GSB biofilm.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out in a Benthic Gradient Chamber (BGC), under a 16 h / 8 h light / dark regime (Fig. 1). The Green Sulfur Bacterium *Prosthecochloris aestuarii* was grown in opposed gradients of sulfide, light and oxygen.

In order to simulate a sediment submerged with a high water column, the light used for the culturing was cut off at 700 nm, which eliminated near infrared light that is most optimal for growth of GSB. Despite, after 5 weeks of culturing, a dense biofilm of *Ptc. aestuarii* was obtained in the BGC sand core. The biofilm location and microbial activities were inferred from microsensors measurements.



Fig. 1. Benthic Gradient Chamber device (Pringault et al., 1996, FEMS Microbiol. Ecol. 20:237-250).

RESULTS

Biofilm location

Backscattered radiance at 750 nm (I_{750}) maximum absorption of Bacteriochlorophyll *c* (BChl. *c*) specific pigment for GSB) was used as a proxy for the pigment-containing organism (Fig. 2).

Up to 1.5 mm depth, the radiance gradually decreased and the corresponding attenuation was equivalent to the value of sterile sediment.

From 1.5 to 2.5 mm, strong attenuation was observed indicating the biofilm location with a maximal biomass at ca. 2.1 mm.

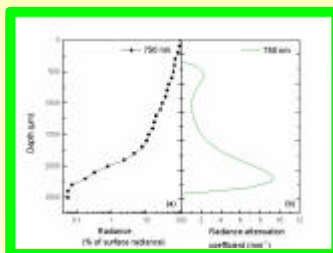


Fig. 2. Backscattered radiance (150°) in a biofilm of *Ptc. aestuarii* cultured in the BGC. (a) Depth profile of backscattered radiance at 750 nm. (b) Depth profile of radiance attenuation coefficient for 750 nm.

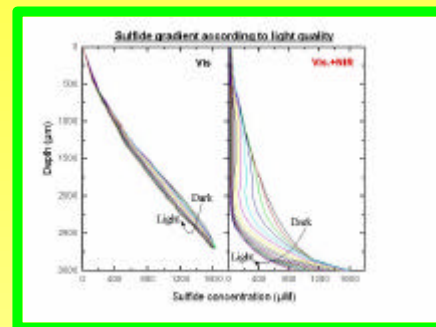


Fig. 3. Sulfide gradient according to light quality.

Sulfide oxidation

Measurements of sulfide gradients as a function of depth and time, during short dark / light cycles (Fig. 3) showed low differences under visible light exposure (light used during the culturing). However, an important decrease of the sulfide gradient was observed in the sand core, when infrared was added.

From these series of measurements, the activity distribution versus depth and time was calculated using numerical procedures to solve the second Fick's law equation.

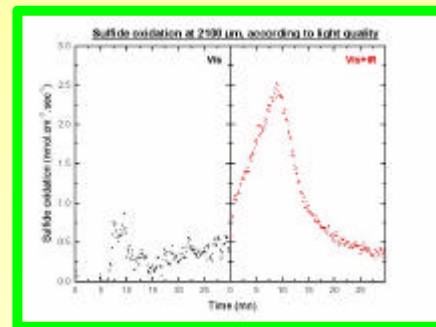


Fig. 4. Sulfide oxidation at 2100 µm according to light quality.

Fig. 4 shows the sulfide oxidation activity as a function of time at 2100 µm, depth of the maximal biomass inferred from radiance measurement (cf. Fig. 2).

Maximal activity was observed in both cases after a 10 min lag phase.

This maximum rate was about 5 times higher when infrared light was implemented. This indicates a strong positive interaction between GSB and the light they are commonly used in natural environments.

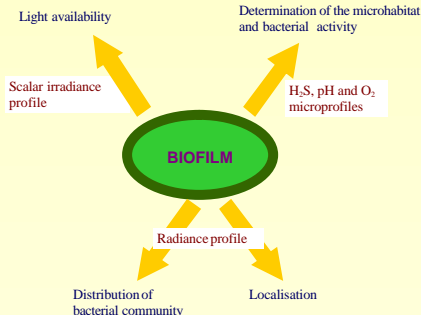
After 10 minutes in visible light, the sulfide activity was constant with time. In contrast, under visible enriched with infrared, activities drastically decreased with time due to the decrease of sulfide availability (Fig. 4).

CONCLUSION

After five weeks of culturing in the Benthic Gradient Chamber, a biofilm of *Prosthecochloris aestuarii* was obtained under light conditions presumably not favorable for the growth.

The photosynthetic activity was strongly influenced by the light quality. Despite bacteria were not cultured under their natural light conditions, they exhibited maximum activity when light was artificially enriched with infrared. This suggests that *Ptc. aestuarii* was able to use wavelengths it was not confronted during its growth.

Biofilm treatment



Acknowledgements

Pr. B.B.Jørgensen and Dr. D. de Beer are thanked for having given the possibility to stay at the Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie (Bremen, Germany). Special thanks to Anja Eggers, Gaby Eickert and Vera Hübler from the microsensor group for having provided the microsensors. This study was supported by a fellowship from the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).

Les bactéries phototrophes anoxygéniques sulfo-oxydantes prolifèrent dans les écosystèmes aquatiques peu profonds. Dans ce travail, nous étudions l'écophysiologie de ces micro-organismes dans des systèmes submergés par une colonne d'eau de profondeur supérieure à 1 mètre. Dans ce cas, la colonne d'eau absorbe les rayons proches de l'infrarouge (IR) de telle sorte que l'intensité lumineuse à la surface du sédiment est amoindrie et le spectre lumineux majoritairement constitué de longueurs d'ondes proches du visible. Ces conditions sont alors critiques pour la croissance des Chlorobiaceae et des Chromatiaceae.

La culture en sédiment artificiel de *Prosthecochloris aestuarii* (Chlorobiaceae) a mis en évidence une hétérogénéité spatiale des conditions limitantes pour la photosynthèse et la croissance. De plus, cette souche bactérienne est capable de réagir à l'addition de rayons IR.

La culture en sédiment artificiel, d'un biofilm mixte de *P. aestuarii* et de *Thiocapsa roseopersicina* (Chromatiaceae) a montré que les micro-organismes coexistent à la même profondeur. Les interactions entre les deux souches bactériennes sont positives pour la bactérie verte dont la biomasse est nettement supérieure comparée à celle estimée en culture axénique. Aucun effet de la coculture n'a été démontré sur *T. roseopersicina*.

Enfin, les adaptations pigmentaires de deux souches de bactéries vertes, *P. aestuarii* et *Chlorobium phaeobacteroides*, ont été étudiées à différentes intensités de lumière verte simulant différentes profondeurs de la colonne d'eau. La réponse adaptative est propre à chaque espèce étudiée. Chez *P. aestuarii*, une seule forme de bactériochlorophylle *c* estérifiée avec le farnesyl est présente. Chez *C. phaeobacteroides*, la bactériochlorophylle *e* comprend une grande quantité de formes de bactériochlorophylle *e*, estérifiées avec des alcools à chaîne linéaire et isoprénoides dont la proportion varie avec l'intensité lumineuse.

Mots clés : Chlorobiaceae, Chromatiaceae, infrarouge, lumière, pigments, photosynthèse.

Experimental ecophysiology of anoxygenic phototrophic sulfur bacteria in sediment systems

Anoxygenic phototrophic sulfur bacteria often develop in very shallow aquatic ecosystems. The aim of this work was to study the ecophysiology of these organisms in sediments submerged by a > 1 meter water column. Under these conditions, infrared wavelengths are filtered out by the water column. Thus, at the sediment surface, light intensity is lowered and the spectral composition comprises mainly visible light. These light conditions are very critical for the photosynthesis and growth of Chlorobiaceae and Chromatiaceae.

The culturing of *Prosthecochloris aestuarii* (Chlorobiaceae) in an artificial sediment showed that limiting conditions for photosynthesis and growth present a spatial and temporal variability. Moreover, this green strain is able to react to the addition of near infrared light.

The coculture of *P. aestuarii* and *Thiocapsa roseopersicina* (Chromatiaceae) in an artificial sediment, showed that both microorganisms coexist at the same depth horizon. Interactions between both bacteria benefit to the green sulfur bacterium: the biomass of *P. aestuarii* was higher in the mixed culture than in the axenic one. No interaction effect was demonstrated for *T. roseopersicina*.

Finally, the chromatic adaptation of two green sulfur bacteria strains, *P. aestuarii* and *Chlorobium phaeobacteroides* was studied under a range of different green light intensities. These conditions simulate light conditions that exist at different depths in the water column. The response was species specific. In *P. aestuarii*, only forms of bacteriochlorophyll *c* esterified with farnesyl were detected. In *C. phaeobacteroides*, the pigment composition comprised bacteriochlorophyll *e* esterified with both isoprenoids and straight chain alcohols, which proportion varied as a function of the light intensity tested.

Key words : Chlorobiaceae, Chromatiaceae, infrared, light, pigments, photosynthesis.
