



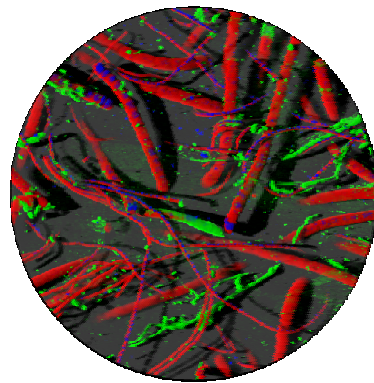
Facultat de Farmàcia
Dept. de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia

Caracterització de biofilms fototròfics d'ambients hipogeus

MÒNICA ROLDÁN MOLINA

2008

Síntesi



Capítol 5

Síntesi

5.1. Tècniques emprades en l'estudi de biofilms fotosintètics	249
5.2. Comunitats fotosintètiques d'ambients hipogeus	251
5.3. Control i prevenció del creixement de biofilms fotosintètics.	253
Canvis a la il·luminació	

L'objectiu principal d'aquest treball experimental ha estat l'estudi dels biofilms fototròfics d'ambients hipogeus, el que ens ha permès d'aprofundir sobre les tècniques d'observació, els organismes i el monitoratge de les comunitats fotosintètiques que s'hi desenvolupen. S'han posat a punt i/o s'han millorat tècniques per examinar l'estructura tridimensional dels biofilms i per identificar els microorganismes i llurs pigments fotosintètics. Amb la informació obtinguda, s'han assajat mètodes per al control i la prevenció del seu desenvolupament.

5.1. Tècniques emprades en l'estudi de biofilms fotosintètics

En primer lloc s'han revisat els protocols de preparació de mostres per a la visualització amb les tècniques de microscòpia convencionals (SEM i TEM, principalment), adaptant-los al tipus de material. També s'han posat a punt els protocols de preparació de mostres per a la visualització en microscòpia confocal, especialment pel que fa a l'estructura tridimensional dels biofilms. Es va utilitzar el canal de reflexió per visualitzar superfícies externes, partícules minerals i/o beines calcificades. Es va utilitzar la fluorescència natural de les clorofil·les i les ficobiliproteïnes per conèixer la distribució en fondària de les microalgues i els cianobacteris que constituïen aquestes comunitats. Els marcadors d'àcids nucleics ens varen permetre visualitzar els nuclis o nucleoides, la seva organització i els plans de divisió cel·lular en l'espai. També es van efectuar tincions dobles per determinar la relació entre els pigments autofluorescents, els àcids nucleics (tenyits amb Hoechst 33258) i els EPS (tenyits amb la lectina Con-A). El canal de fluorescència dels pigments, acoblat amb el marcatge de Con-A, va permetre visualitzar la forma, l'organització i el gruix de les beines mucilaginoses que envolten els microorganismes fotosintètics, així com les substàncies polimèriques extracel·lulars presents al biofilm. La combinació d'aquestes metodologies ha permès el reconeixement de diferents caràcters, a part de la morfologia, com plans de divisió, distribució

dels til·lacoids i/o de cloroplasts, localització de cèl·lules especialitzades o tipus de ramificació i organització dels agregats, per a la identificació i la caracterització dels cianobacteris i altres microorganismes fotosintètics.

El processament de les seccions per obtenir els diferents tipus d'imatges tridimensionals va permetre caracteritzar l'estructura dels biofilms, mostrant la distribució espacial dels microorganismes, els EPS i el substrat respecte als eixos x , y i z , així com la disposició i la morfologia dels microorganismes a cada nivell. També s'ha pogut estudiar la viabilitat, la citomorfologia i l'estructura tridimensional de les comunitats que formen, així com l'observació de l'estratificació i la porositat d'aquestes comunitats.

Per completar la informació descriptiva que ens aportaven les imatges tridimensionals, es va elaborar un programa informàtic en una plataforma Java. El programa permet la lectura, la conversió de formats i el tractament d'imatges TIFF provinents del microscopi confocal Leica TCS-SP2. Això inclou la lectura dels fitxers generats pel microscopi Leica i l'extracció de la informació necessària del biofilm que s'està analitzant, la conversió del format Leica (i d'altres possibles) al format propi i la possibilitat de salvar els resultats en un fitxer de text, així com la possibilitat de carregar els resultats prèviament emmagatzemats. Posteriorment, es van implementar les diferents funcions de quantificació útils per a l'estudi d'aquestes comunitats: biovolum, distribució de biomassa, gruix mitjà, distribució del gruix, rugositat, porositat i distribució de la porositat, cobertura de la superfície i càlcul automàtic del llindar per a cada imatge de la sèrie corresponent a un biofilm. Aquestes funcions han estat útils per a les posteriors caracterització i comprensió de l'estructura del biofilm i el monitoratge. A part de les funcions de quantificació, l'aplicació incorpora una reconstrucció 3D del volum del biofilm, així com un visor d'imatges per contrastar si el llindar seleccionat és l'adequat.

Pel que fa a l'anàlisi dels pigments fotosintètics presents en cadascun dels microorganismes fototròfics, s'ha posat a punt un mètode per obtenir els espectres de fluorescència d'una àrea seleccionada de la mostra mitjançant el microscopi confocal espectral (Patent WO/2005/052559). S'han estudiat les

possibilitats i les limitacions d'aquesta tècnica utilitzant pigments purs, cultius d'un cianobacteri –*Nostoc humifusum*– i una alga verda –*Muriellopsis* sp.–, de pigments ja caracteritzats, i biofilms naturals procedents d'ambients hipogeu. Els espectres dels pigments purs es van correlacionar bé amb els espectres publicats pertanyents a pigments extrets. Espècies pertanyents a diferents grups filogenètics, com Cyanobacteria, Bacillariophyta o Chlorophyta, van presentar unes característiques i unes propietats de fluorescència dels seus pigments característiques que en permetien la discriminació respecte d'altres grups filogenètics. Així mateix, amb aquesta tècnica es va poder determinar quines eren les espècies de cianobacteris amb ficoeritrina i sense.

5.2. Comunitats fotosintètiques d'ambients hipogeu

El segon aspecte fonamental ha estat l'estudi específic d'aquestes comunitats. S'han determinat els microorganismes fotosintètics més representatius de diferents tipus de cavitats naturals i catacumbes, així com la seva distribució i els factors ambientals a què estan sotmesos, en la natura i en cultiu. En els ambients hipogeu prospectats, la temperatura i la humitat eren relativament elevades i constants, mentre que la llum, tant la solar que entrava en coves i avencs, com l'artificial, per il·luminar coves turístiques o catacumbes, semblava el factor determinant de la presència i la distribució dels microorganismes i dels biofilms que formaven. Aquestes microcomunitats que creixien sobre la roca il·luminada mostraven aparença de clapes o bandes acolorides. Les observacions microscòpiques permetien visualitzar agregats heterogenis de filaments entortolligats o cocs, esclarissats o premudament embeguts en mucíl·lag.

En les tres cavitats naturals prospectades al massís càrstic del Garraf (Barcelona, NE Espanya), la temperatura, la humitat relativa i la llum, presentaven clars gradients, des de l'entrada fins a una certa profunditat, on les condicions romanien constants. Així mateix, la localització dels biofilms i la diversitat dels organismes fototròfics també mostraven unes pautes comunes

en correspondència amb els gradients abiòtics. Les estratègies protectores contra la dessecació i la irradiació desapareixien gradualment de l'entrada al fons: biofilms formats per cianobacteris cocals mucilaginosos i de color fosc es van tornar més prims amb la disminució de la llum i gradualment van ser substituïts per biofilms formats per cianobacteris filamentosos amb beines transparents calcificades, com *Geitleria calcarea* i *Loriella osteophila*, que produïen taques blanques a les parets. En general, a l'entrada de les cavitats es va observar la majoria d'espècies trobades pertanyents als grups Chlorophyta i Bacillariophyta. Els líquens crustacis de l'entrada de les cavitats van ser substituïts per altres de tal·lus leprós, com *Botryolepraria lesdainii* i *Macentina stigonemoides*. Els biofilms es van distribuir en mosaic en els avencs, mentre que a les coves es distribuïen en forma de cinturons més o menys continus. Les diferències en la disponibilitat de l'aigua i la duresa del substrat podrien explicar les variacions en la composició de les espècies i la distribució en mosaic en la roca calcària.

A les Catacumbes Romanes, els principals organismes formadors de biofilms van ser les moltes i els cianobacteris filamentosos amb beina. L'estructura dels biofilms era heterogènia, especialment en gruix, densitat i composició d'organismes, però podien ser classificats en funció dels principals organismes que els formaven. De manera semblant al cas de les coves i els avencs, es va observar una diversitat decreixent en els biofilms fototròfics en disminuir la irradiància. Els biofilms a més baixa il·luminació eren porosos i estaven formats únicament per filaments erectes de *Leptolyngbya* spp. Excepte per a aquest tipus de biofilm, la composició dels organismes no estava clarament relacionada amb un gradient decreixent d'il·luminació. *Leptolyngbya* sp., l'espècie més ubiqüista, conté un alt nombre de ficobilisomes i els seus hormogonis presenten un moviment lliscant que permet la colonització del substrat. A la majoria de cianobacteris filamentosos – *Leptolyngbya* spp. i *Scytonema* spp.–, els hormogonis són una forma diferenciada del creixement, que serveix per a la dispersió a curtes distàncies, l'adhesió i el subsegüent establiment de biofilms. Els mecanismes que

intervenien en aquesta adhesió són complexos i inclouen interaccions no específiques i propietats determinades pels organismes i per les condicions ambientals. L'autofluorescència i el marcatge selectiu dels EPS i del DNA han permès visualitzar determinades estructures de forma discriminada i seguir la formació de les substàncies mucilaginoses que intervenen en els primers passos dels processos d'adhesió dels hormogonis. En aquests cianobacteris filamentosos, el primer aspecte visible de la diferenciació dels hormogonis va ser la formació de cèl·lules que ajudaven al trencament del tricoma, anomenades necridis. Procedents de cèl·lules vegetatives, els hormogonis presenten un increment de la intensitat de fluorescència i de la producció de polisacàrids intracel·lulars. El trencament del tricoma i l'alliberament dels hormogonis van ser causats per la desintegració d'aquestes cèl·lules necrídiques, que en l'últim pas només mostraven fluorescència de les substàncies polisacàridiques. Els extrems polisacàridics semblen actuar com a mecanismes d'adhesió, com una mena de goma d'enganxar al començament de l'adhesió de l'hormogoni al substrat.

5.3. Control i prevenció del creixement de biofilms fotosintètics. Canvis a la il·luminació

Conèixer tota aquesta informació sobre els biofilms ens ha permès elaborar una estratègia ben definida per combatre'n el desenvolupament en monuments il·luminats artificialment. El factor més important que influïa en els biofilms, majoritàriament fotosintètics, fou la llum; el rang de longituds d'ona menys absorbit el corresponent a la zona del verd (500-560 nm). Amb l'objectiu d'avaluar el potencial de la llum verda per prevenir el creixement del biofilms fototròfics es va examinar l'efecte de la llum blanca i el de la llum verda en biofilms formats pel cianobacteri *Gloeotheca membranacea* (Cyanobacteria) i l'alga verda *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta), totes dues espècies presents en hàbitats de baixa il·luminació. L'aparell fotosintètic de cèl·lules en llum verda

presentava significativament menys intensitat de fluorescència en ambdues espècies. Així mateix, la densitat d'EPS en biofilms formats per *G. membranacea* era menor que en els que creixien sota llum blanca. Mentre aquests efectes van ser moderats per a *G. membranacea*, atès que conté molts pigments accessoris, *C. sorokiniana*, que no en té, pràcticament va desaparèixer sota llum verda. La resposta dels biofilms a la llum verda va comprendre diferències en la fluorescència dels pigments, el gruix dels biofilms i el biovolum, així com la simplificació de la seva estructura tridimensional, si es compara amb els biofilms sota llum blanca. També es va estudiar l'efecte que produeix la llum verda en la morfologia i la ultraestructura de l'espècie aeròfica *Gloeocapsopsis magma*, aïllada de la cova turística de Collbató (Barcelona, NE Espanya), en cultius de dos mesos d'edat sota llum verda (comparant-los amb els cultius crescuts en llum blanca). Les beines de les cèl·lules sota llum verda no eren estratificades, mentre que les de llum blanca presentaven una clara estratificació. Les cèl·lules sota llum verda van ser significativament més llargues que les cèl·lules sota llum blanca de la mateixa edat. Respecte de la ultraestructura, les cèl·lules en llum verda contenien només alguns tilacoides distribuïts a l'atzar, grànuls de cianoficina i polifosfats dispersos en el citoplasma. Les cèl·lules sota llum blanca presentaven grups de tilacoides paral·lels ben definits que formen dues meitats. Encara que *Gloeocapsopsis magma* exposada a llum verda sobreviu a la natura i en cultiu, la pèrdua de pigments i el desequilibri de la seva ultraestructura revela que aquest organisme està al límit de la seva adaptació a aquestes condicions. Tots aquests resultats suggereixen que la llum verda contribueix al decreixement de la diversitat específica i, per tant, pot esdevenir una estratègia eficient per controlar el desenvolupament dels biofilms fototròfics en monuments hipogeus il·luminats artificialment, fins i tot en els dominats per cianobacteris rics en pigments accessoris, com la ficoeritrina.

Per altra banda, es va estudiar *in situ* l'efecte que produïa la suma de factors: la presència de llum verda i l'aplicació dels biocides convencionals utilitzats en les neteges de les obres d'art. Es va seleccionar com a zona d'estudi

model la cova de Collbató (Barcelona, NE Espanya). Es va avaluar l'efecte de la neteja mecànica, simultàniament amb l'aplicació de dues formulacions del biocida clorur de benzoalconi i l'ús de la llum verda, escollint com a control zones comparables, sotmeses als mateixos tractaments però il·luminades amb làmpades de llum blanca. Els resultats d'aquest estudi van demostrar que les dues formulacions del clorur de benzoalconi redueixen la biomassa, registrada d'acord amb els nivells de fluorescència comparats amb els dels controls. A més, l'abundància de *Scytonema julianum* i altres espècies predominants va disminuir, excepte en els casos de *Nostoc punctiforme* i *Gloeocapsopsis magma*, ambdues cobertes amb beines de polisacàrids molt gruixudes i amb un ampli ventall de pigments accessoris.

El conjunt de tècniques emprades en aquest recull de treballs sobre les comunitats fotosintètiques d'hàbitats aerofítics hipogeus ha permès no sols l'estudi de la riquesa d'espècies i els seus pigments, sinó també el de la colonització del substrat. L'anàlisi s'ha basat en la distribució dels taxa a l'interior de la roca i ha mostrat la disposició dels grups filogenètics, relacionant-los amb determinats paràmetres abiòtics.

Els ambients que han estat objecte de mostratge es caracteritzen per ser colonitzats per espècies característiques de baixa il·luminació, en especial els cianobacteris, pels seus pigments accessoris. La seva presència en l'interior del substrat o la presència superficial de patines contribueix a l'enlletgiment i la degradació de les superfícies. Molts dels microorganismes fotosintètics presenten beines gelatinoses i/o calcificades, que els permeten resistir condicions de sequera variables i altres condicions desfavorables, depenent de la seva posició en el substrat i en el propi biofilm. La capacitat de resistència inclou les substàncies químiques emprades en les neteges dels monuments, que mostren poca efectivitat a curt termini i nul·la a llarg termini. La il·luminació amb làmpades de llum verda es presenta com una estratègia simultània o alternativa per evitar el biodeteriorament, en el cas de les obres d'art il·luminades artificialment. La llum verda, en el màxim de la visió humana, contribueix a alentir el creixement dels microorganismes fotosintètics i fa que penetrin menys a l'interior dels substrats.

Síntesi
